

DIE PHOTOSYNTHETISCHE AKTIVITÄT VON CHLOROPLASTEN NACH VERÄNDERUNG DER OBERFLÄCHE DER THYLAKOIDMEMBRAN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Wolfgang Lockau
aus Seeheim

Bochum 1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546603_0046

DIE PHOTOSYNTHETISCHE AKTIVITÄT VON CHLOROPLASTEN NACH VERÄNDERUNG DER OBERFLÄCHE DER THYLAKOIDMEMBRAN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum



von

Wolfgang Lockau
aus Seeheim

Bochum 1976



Tag der mündlichen Prüfung: 15. 3. 1976

Referent: Prof. Dr. A. Trebst

Korreferent: Prof. Dr. J. Feierabend

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1973 bis 1976 im Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Trebst durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Ergebnisse	4
2.1. Charakterisierung von Photosystem I	4
2.2. Einfluß chemischer Modifikation der Thylakoidmembran mit impermeablen Proben auf Photosystem I	5
2.2.1. Allgemeine Methodik	5
2.2.2. Hemmung von Photosystem I durch chemische Modifikation der Membranoberfläche	8
a. Modifikation der Membran im nichtenergetisierten Zustand (Bindung im Dunkeln)	8
b. Modifikation der energetisierten Membran (Bindung im Licht)	15
2.2.3. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.2. ...	26
2.3. Einfluß des Elektronentransportes auf die Reaktivität der Diazoniumsalze	29
2.3.1. Reduktion von Diazoniumsalzen durch Chloroplasten im Licht	30
2.3.2. Korrelation der photosynthetischen Reduktion von DABS mit der lichtabhängigen Bindung der Probe an die Thylakoidmembran	38
2.3.3. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.3. ...	44
2.4. Hemmung von Photosystem I durch ein Antiserum gegen eine strukurelle Komponente	47
2.4.1. Vergleich des Einflusses von Antiseren und chemischer Modifikation auf Photosystem I	47
2.4.2. Polyphenoloxidase-Aktivität von HM 275	49
2.4.3. Abtrennung der Polyphenoloxidase-Aktivität der HM 275-Präparation von der Antigen-Aktivität .	53
2.4.4. Funktion des Antigens in der Membran	56
2.4.5. Antiseren gegen gereinigtes HM 275	60
2.4.6. Reaktion von HM 275 in situ mit ³⁵ S-DABS	62
2.4.7. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.4. ...	64
3. Diskussion	67
4. Zusammenfassung	77
5. Material und Methoden	80
6. Literaturverzeichnis	89

Abkürzungen

Asc.	Na-Ascorbat
AQSO ₃ ⁻	Anthrachinon-2-sulfonat
Cyt.	Cytochrom
Chl	Chlorophyll
CpM	Counts per minute
DABS	p-(Diazonium)-benzolsulfonat
DAD	Diaminodurool (2,3,5,6,-Tetramethyl-p-phenylendiamin)
DEMIB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon
DCMU	3(3',4'-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol
Fd.	Ferredoxin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
M	molar
min	Minute
MV	Methylviologen
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
PCy	Plastocyanin
PMS	N-Methyl-phenazonium-methosulfat
PQ	Plastchinon
PS I, PS II	Photosysteme I und II
PTBDF	p-(Trimethylamino)-benzoldiazonium-tetrafluoroborat
Q	Quencher
Reduktase,	Ferredoxin-NADP-Reduktase (E.C. 1.6.7.1.)
Red.	
sec	Sekunde
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
P ₇₀₀	Reaktionszentrum von Photosystem I
ESR	Elektronenspinresonanz
SDS	Na-Dodecylsulfat

1. Einleitung

In der Lichtphase der Photosynthese wird H_2O oxidiert und NADP reduziert. Dieser durch Lichtabsorption getriebene Elektronentransport erfolgt über zwei in Serie geschaltete Lichtreaktionen (Photosystem II und Photosystem I), die über eine Reihe von Redox-Carriern miteinander gekoppelt sind. Bis einschließlich des Reduktanten des löslichen Ferredoxins sind die Komponenten des Elektronentransportsystems an das innere Membransystem, die Thylakoide, der Chloroplasten gebunden.

Die Photosysteme und Redox-Carrier sind in der Thylakoidmembran nicht statistisch verteilt. In den letzten Jahren mehren sich Befunde, die für einen gerichteten Transport von Elektronen und Ionen über die Membran hinweg sprechen. Bereits 1965 interpretierten Hind und Jagendorf die durch den Elektronentransport bei Belichtung verursachten Veränderungen der Lichtstreuung von Thylakoidvesikeln als Folge eines transmembranen Protonengradienten. Blitzlicht-induzierte Absorptionsänderungen von Pigmenten der Thylakoidmembran (Rumberg 1964, Witt et al. 1965, Schliephake et al. 1968) wurden als Folge eines lichtinduzierten Feldaufbaues über die Membran hinweg erkannt (Junge und Witt 1968); dieses elektrische Feld konnte inzwischen direkt gemessen werden (Fowler und Kok 1974).

Biochemische Untersuchungen zur Lokalisierung der Komponenten des Elektronentransportsystems unterstützen die Hypothese der Anisotropie der Thylakoidmembran. Für Photosystem II erscheinen die Ergebnisse, besonders soweit die Lokalisation des Wasserspaltungssystems betroffen ist, noch widersprüchlich (für eine Diskussion dieser Problematik siehe Trebst 1974).

Nach Hauska et al. (1971) können Antikörper den vermutlichen Elektronendonator von Photosystem I, Plastocyanin, nicht ohne Aufbrechen der Membran erreichen. Dasselbe gilt für Cytochrom f, dem eine Funktion an der Donorseite von Photosystem I zugesprochen wird, und Cytochrom 552, dem vermutlichen Pendant von Plastocyanin in Euglena (Racker et al. 1971, Wildner und Hauska 1974). Auch für Redoxsubstanzen, die in ihrer sulfonierten Form die Thylakoidmembran nicht permeieren können, ist die Donorseite von Photosystem I nicht erreichbar (Hauska 1972, Hauska et al. 1973). Die Schlußfolgerung ist, daß die Donorseite von Photosystem I für impermeable Substanzen unerreichbar und zum Innenraum der Thylakoidvesikel hin orientiert ist.

Mithilfe von Antisera wurden bereits Untersuchungen über die Lokalisation der Akzeptorseite von Photosystem I durchgeführt. Der Elektronentransport kann dort durch Antisera bei intakter Membran gehemmt werden (Berzborn et al. 1966, Regitz et al. 1970, Bengis und Nelson 1975). Die gebundene Ferredoxin-NADP-Reduktase ist nach den Agglutinationsversuchen von Berzborn (1968, 1969) in einer Vertiefung der Membranoberfläche lokalisiert, in der Hiedemann-Van Wyk und Kannangara (1971) eine Adsorption des löslichen Ferredoxins annehmen. Wahrscheinlich ist die Ferredoxin-NADP-Reduktase in der Nähe der Akzeptorseite von Photosystem I lokalisiert. Die Strukturierung dieser Akzeptorseite ist unbekannt, es läßt sich aber vermuten, daß neben der noch ausstehenden Identifizierung des primären Elektronenakzeptors von Photosystem I zur Aufklärung des Mechanismus der Ferredoxin-Reduktion durch Photosystem I auch eine detaillierte Kenntnis seines Reduktionsortes nötig ist. In Abbildung 1 ist die heutige Vorstellung über die räumliche

Anordnung der Komponenten des Elektronentransportsystems in der Thylakoidmembran schematisch dargestellt.

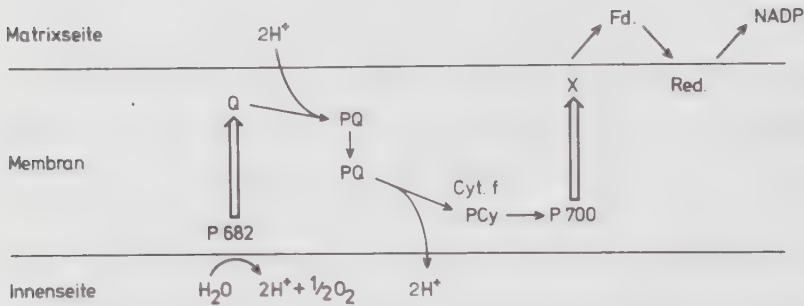


Abb. 1: Räumliche Anordnung der Komponenten des Elektronentransportsystems der Chloroplasten in der Thylakoidmembran

Die Problemstellung dieser Arbeit ist ausschließlich auf die Funktion und Strukturierung von Komponenten auf der Akzeptorseite von Photosystem I konzentriert. Mithilfe biochemischer Methoden wurde eine detaillierte Untersuchung der räumlichen Struktur und der funktionellen Umgebung dieses an der Matrixseite der Thylakoide lokalisierten Membranbereiches angestrebt. Als Methoden zur Modifikation dieses Bereiches der Membranoberfläche wurden Antikörper und impermeable chemische Sonden verwendet. Letztere zeichnen sich durch ihre geringe Größe und die Wählbarkeit ihrer Ladung aus.

Zunehmend wird eine Beteiligung von Konformationsänderungen der Membran an einzelnen Reaktionen des Elektronentransportes angenommen. Sie sind für den Kopplungsfaktor der Photophosphorylierung (CF_1) mit chemischen Proben nachgewiesen worden (Ryrie und Jagendorf 1971, 1972; McCarty et al. 1972; McCarty und Fagan 1973). Eine mit dem Elektronentransport gekoppelte Konformationsänderung in Photosystem I, die aufgrund von Studien mit chemischen Sonden vermutet wird, wird in der Arbeit untersucht. Die Ergebnisse vertiefen unsere Kenntnis von Funktion und Struktur von Photosystem I und lassen Vorteile und Nachteile von Untersuchungen mit chemischen Sonden und Antikörpern und ihre Aussagekraft erkennen.

2. Ergebnisse

2.1. Charakterisierung von Photosystem I

In der Arbeit wird der Einfluß von Antikörpern und chemischer Modifikation auf die Aktivitäten von Photosystem I in isolierten Lamellarsystemen von Chloroplasten untersucht. Zur Lokalisation der Wirkung wurden im Wesentlichen Reaktionen benutzt, die nur Photosystem I benötigen (Abb. 2).

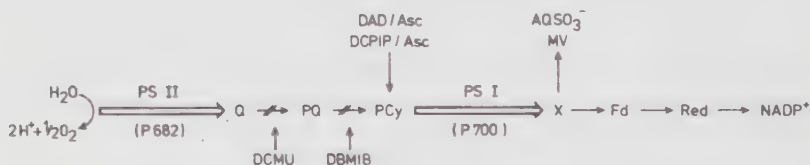


Abb. 2: Schematische Darstellung der zur Charakterisierung von Photosystem I verwendeten Teilsequenzen des Elektronentransportsystems

Der Elektronentransport durch Photosystem II und die Wasserspaltungsreaktion wurden durch 3(3',4'-Dichlorphenyl)-dimethylharnstoff (DCMU) blockiert und als artifizielle Elektronendonoren für Photosystem I Diaminodurol (DAD) oder 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPIP) benutzt, die durch Ascorbat reduziert gehalten wurden. Als Elektronenakzeptoren dienten außer dem physiolo-

gischen Akzeptor NADP die autoxidablen Akzeptoren Methylviologen (MV) und Anthrachinonsulfonat (AQSO_3^-). Bei Verwendung von NADP muß dem Testsystem Ferredoxin zugesetzt werden, da die verwendeten aufgebrochenen Chloroplasten dieses nicht mehr in sättigenden Mengen enthalten.

2.2. Einfluss chemischer Modifikation der Thylakoidmembran mit impermeablen Proben auf Photosystem I

2.2.1. Allgemeine Methodik

Zur chemischen Modifikation der Thylakoidmembran wurden zwei verschieden substituierte Benzoldiazoniumsalze verwendet. p-(Diazonium)-benzolsulfonat (DABS) ist ein zwitterionisches Molekül, p-(Trimethylamino)-benzoldiazoniumtetrafluoroborat (PTBDF) zweifach positiv geladen (Abb. 3).

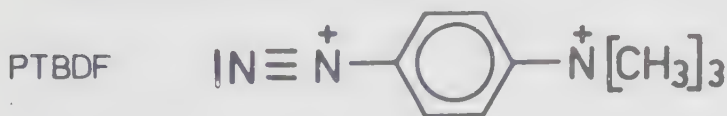


Abb. 3: Strukturformeln von DABS und PTBDF

Die Diazoniumsalze reagieren mit Proteinen und Lipiden kovalent zu Azo-, Diazoamino- und S-Azo-Derivaten, besitzen also eine geringe Gruppenspezifität. Wegen ihrer Hydrophilie stellen sie dagegen hohe Anforderungen an die Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen in der Membran. Sie eignen sich daher besonders gut zur Charakterisierung der Membranperipherie, im Falle von Membranvesikeln zur Charakterisierung der "Außenseite" der Membran, d.h. der zu der die Vesikeln umgebenden wässrigen Phase hin orientierten Membranoberfläche. Wegen dieser Eigenschaften wurde DABS zur Analyse der peripheren Proteine der Erythrocytenmembran (Berg 1969) und der inneren Membran der Mitochondrien (Schneider et al. 1972) verwendet. Beide Membransysteme enthalten im Innern der Vesikel interne Marker, Hämoglobin im Falle der Erythrocyten, den Kopplungsfaktor F_1 im Falle der Mitochondrien, die es erlauben zu entscheiden, ob das Diazoniumsalz die Membran permeieren kann oder nicht. DABS kann weder die Erythrocyten- noch die Mitochondrienmembran rasch permeieren, für PTBDF ist dies für die Erythrocytenmembran nachgewiesen worden (Berg 1969). Obwohl bei Chloroplasten kein interner Marker sicher bekannt ist, kann angenommen werden, daß auch die Thylakoidmembran für hydrophile Diazoniumsalze weitgehend impermeabel ist (Dilley et al. 1972).

Aus diesen Gründen können die Diazoniumsalze als molekulare Sonden zum Abtasten der Oberfläche der Thylakoidmembran verwendet werden. Ihre Verwendung ist nicht auf das Studium der Membranoberfläche im nicht energetisierten Zustand, d.h. im Falle der Chloroplasten im Dunkeln, beschränkt. Es sollte vielmehr festgestellt werden können, ob im energetisierten Zustand der

Membran neue reaktive Gruppen den Diazoniumsalzen exponiert werden. Auf diese Weise würden durch den Elektronentransport verursachte Konformationsänderungen, die auch die Membranoberfläche verändern, mit den Proben nachgewiesen werden können.

Die allgemeine Methodik besteht darin, die isolierten Thylakoidsysteme mit den Diazoniumsalzen unter verschiedenen Bedingungen zu inkubieren und das nichtgebundene Reagenz durch Zentrifugation auszuwaschen. Die Modifikation der Membranoberfläche kann auf zwei Weisen gezeigt werden:

1. Durch Messung von Teilsequenzen des photosynthetischen Elektronentransportes können durch die Modifikation verursachte Hemmungen lokalisiert werden.
2. Das Ausmaß der Bindung der Proben an die Membran kann durch Verwendung radioaktiv markierter Proben quantitativ bestimmt werden.

Die Kombination beider Methoden ermöglicht eine Korrelation von Bindung und Hemmung.

Der Vergleich zweier unterschiedlich geladener Diazoniumsalze sollte zeigen, ob Veränderungen der Ladung der Membranoberfläche Einfluß auf Reaktionen des Elektronentransportes hat. DABS führt bei seiner Reaktion negative Ladungen, PTBDF positive Ladungen in die Oberfläche der Membran ein. Ein Vergleich mit Diazoniumsalzen ohne geladene Substituenten ist nicht möglich, da sie vermutlich biologische Membranen rasch permeieren (Berg 1969).

2.2.2. Hemmung von Photosystem I durch chemische Modifikation der Membranoberfläche

2.2.2.a. Modifikation der Membran im nicht energetisierten Zustand (Bindung im Dunkeln)

Die Inkubation der Thylakoidmembran mit den Diazoniumsalzen DABS und PTBDF führt zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Membran. Wenn anschließend die NADP-Reduktion getestet wird, ist diese Reaktion, verglichen mit unbehandelten Kontroll-Chloroplasten, zu 72% im Falle von DABS, zu 55% im Falle von PTBDF gehemmt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich der Hemmung von Photosystem I Teilreaktionen durch DABS und PTBDF nach Inkubation im Dunkeln

1.a: Reaktion DAD/Ascorbat $\longrightarrow$ NADP

	Elektronentransport ($\mu\text{eq}/\text{mg Chl}/\text{h}$)	Hemmung in %
Kontrolle	138	--
1 mM PTBDF 1' Dunkel	61	55
Kontrolle	133	--
1 mM DABS 1' Dunkel	18	72

1.b: Reaktion DAD/Ascorbat $\longrightarrow$ MV

	Elektronentransport (μ equ/mg Chl/h)	Hemmung in %
Kontrolle	610	--
1 mM PTBDF 1' Dunkel	528	13
Kontrolle	658	--
1 mM DABS 1' Dunkel	600	9

Inkubationsbedingungen: Chloroplasten mit 1 mg Chl/ml in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl wurden, wie in der Tabelle angegeben, bei 0-4°C mit den Diazoniumsalzen inkubiert. Testbedingungen: Siehe Material und Methoden. Zur NADP-Reduktion wurde das Testgemisch (Volumen 1 ml) in Küvetten für 4 min belichtet.

Da als Elektronendonorsystem DAD/Ascorbat verwendet wurde und der Elektronentransport im Bereich von Photosystem II durch DCMU blockiert war, muß die Hemmstelle in Photosystem I lokalisiert sein. Die Hemmung der entsprechenden Photooxidation mit Methylviologen als Elektronenakzeptor ist trotz erheblich höherer Elektronentransportraten sehr viel geringer als die der NADP-Reduktion. Es muß also durch die Modifikation eine (oder mehrere) Komponente von Photosystem I gehemmt worden sein, die an der Reduktion von Methylviologen nicht beteiligt ist, jedoch an der NADP-Reduktion.

Eine Hemmung auf der Stufe des Ferredoxins scheidet aus, da dieses erst nach der Modifikation der Thylakoide dem Testansatz zugegeben wurde. Demgegenüber könnte die an die Membran gebundene Ferredoxin-NADP-Reduktase modifiziert worden sein. Deshalb wurde geprüft, ob sich durch exogene Ferredoxin-NADP-

Reduktase die Hemmung der NADP-Reduktion wieder aufheben läßt. Die Aufhebung der Hemmung durch exogene Reduktase gelingt nur teilweise (Abb. 4). Die gebundene Reduktase ist durch die Modifikation der Thylakoide zwar in ihrer Funktion beeinträchtigt worden, kann aber nicht die einzige gehemmte Komponente sein.

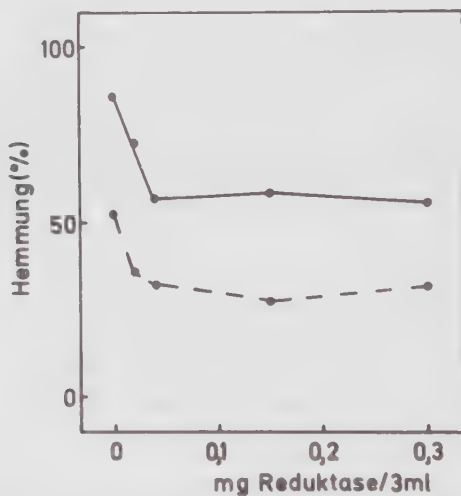


Abb. 4: Einfluß exogener Reduktase auf die Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat $\longrightarrow$ NADP durch chemische Modifikation

x — x: Modifikation mit DABS, x --- x: Modifikation mit PTBDF

Inkubationsbedingungen: Chloroplasten mit 1 mg Chl/ml in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl wurden mit 2 mM DABS bzw. PTBDF für 1 min bei 0-4°C im Dunkeln inkubiert.

Testbedingungen: Siehe Material und Methoden. Die Ansätze wurden im Warburg-Apparat bei 15°C für 15 min belichtet.

Kontrollraten: Versuch mit DABS: 84 μ Mol NADPH/mg Chl/h

Versuch mit PTBDF: 92 μ Mol NADPH/Mg Chl/h

DABS hemmt die NADP-Reduktion stärker als PTBDF (Tabelle 1). Das unterschiedliche Ausmaß der Hemmung bleibt auch bei Umgehung der Reduktase-Hemmstelle erhalten. Da die Reaktionssequenz Ferredoxin $\rightarrow$ Ferredoxin-NADP-Reduktase $\rightarrow$ NADP nach derzeitiger Kenntnis keine weiteren Komponenten enthält, muß der gehemmte Reaktionsschritt die Reduktion des Ferredoxins oder eine andere Reaktion auf der Akzeptorseite von Photosystem I sein. Einzelheiten der näheren Charakterisierung der Hemmung dieser unbekannten Komponente zeigen die folgenden Abbildungen von Versuchen, in denen die Inkubationsbedingungen während der Modifikation der Thylakoide mit den Diazoniumsalzen variiert wurden.

Abbildung 5 zeigt die Abhängigkeit der Hemmung der NADP-Reduktion von der Konzentration der Diazoniumsalze.

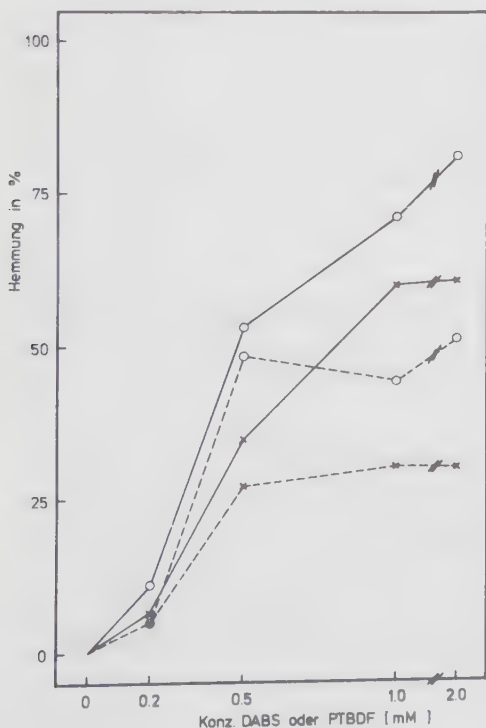


Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ NADP durch chemische Modifikation im Dunkeln
 —: Modifikation mit DABS
 o — o: Test ohne, x — x: Test mit exogener Reduktase.
 ---: Modifikation mit PTBDF
 o --- o: Test ohne, x --- x: Test mit exogener Reduktase.

Inkubationsbedingungen: Chloroplasten mit 1 mg Chl/ml in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl wurden für

1 min bei den angegebenen Konzentrationen an Diazoniumsalz bei 0-4°C inkubiert.

Testbedingungen: Die in Material und Methoden beschriebenen Testansätze mit einem Gesamtvolumen von 1 ml wurden für 5 min belichtet.

Kontrollraten: Ansätze ohne exogene Reduktase: 65-90 μMol NADPH/mg Chl/h. Mit exogener Reduktase: 80-140 μMol NADPH/mg Chl/h.

Die Hemmung der Reaktion durch DABS nimmt bis zur höchsten getesteten Konzentration (2 mM) zu. Exogene Reduktase hebt die Hemmung in jedem Fall teilweise wieder auf, die maximale Hemmung der Ferredoxin-Reduktion beträgt etwa 60%. Eine so große Hemmung wird durch die Modifikation mit PTBDF nicht erreicht. Sie beträgt maximal 50% und geht bei Zugabe von Reduktase zum Testansatz auf etwa 25% zurück.

Das unterschiedliche Ausmaß der Hemmung der Ferredoxin-Reduktion kann darauf beruhen, daß beide Diazoniumsalze verschiedenen schnell mit der hemmbaren Komponente reagieren. Es ist jedoch auch denkbar, daß die in gleicher Weise gebundenen Diazoniumsalze aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Struktur diese Reaktion unterschiedlich beeinflussen. Die Bindung von unspezifisch mit der Membranoberfläche reagierenden Proben an eine unbekannte Komponente kann jedoch nicht gemessen werden.

Da DABS ein Zwitterion, PTBDF aber zweifach positiv geladen ist, kann man annehmen, daß wegen elektrostatischer Wechselwirkungen ihr Zugang zum betreffenden Reaktionsort verschiedenen stark beeinflußt wird. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist jedoch gering, da zur Inkubation ein Puffer hoher Ionenstärke verwendet wurde (50 mM K-Phosphat-Puffer, 100 mM NaCl). Auch eine Verlängerung der üblichen Inkubationszeit von 1 auf 5 min

läßt die Unterschiede in der Hemmung der Reaktion durch die beiden Substanzen unverändert (Abb. 6).

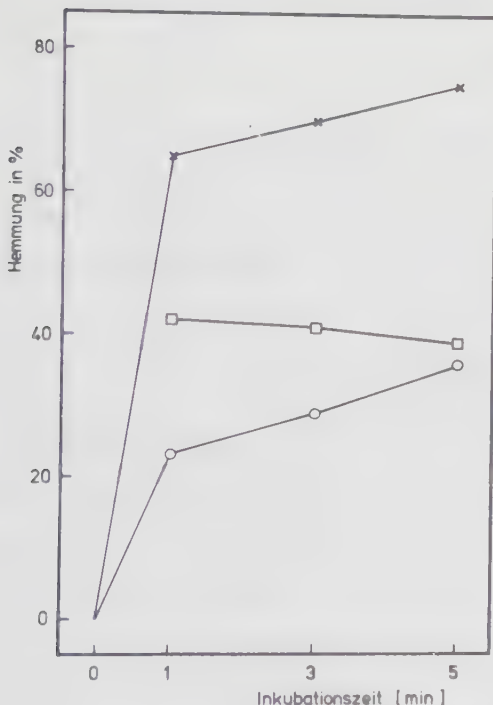


Abb. 6: Zeitabhängigkeit der Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat
 → NADP durch DABS oder PTBDF bei Modifikation im Dunkeln
 x—x: Modifikation mit DABS, o—o: Modifikation mit PTBDF
 □—□: Differenz der Hemmung

Inkubationsbedingungen: Chloroplasten mit 1 mg Chl/ ml in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl wurden mit 2 mM DABS oder PTBDF für die angegebene Zeit bei 0-4°C im Dunkeln inkubiert.

Testbedingungen: Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden in

einem Querbeleuchtungs-Spektralphotometer die Anfangsraten der NADP-Reduktion gemessen. Die Testmischung enthielt eine sättigende Menge exogener Reduktase.

Kontrollrate: 172 μ Mol NADPH/mg Chl/h.

Da der pH-Wert während der Kupplungsreaktion sowohl die Reaktivität des Diazoniumsalzen als auch die Reaktivität des Kupplungsreagenzes beeinflussen kann (vergl. z.B. Morrison-Boyd S. 781-782), wurde die Modifikation der Thylakoide bei verschiedenen pH-Werten während der Inkubation durchgeführt.

Wie Abb. 7 zeigt, bleibt das Ausmaß der Hemmung der Ferredoxin-Reduktion durch die beiden Diazoniumsalze unter diesen Bedingungen konstant ebenso wie die Differenz der Hemmung.

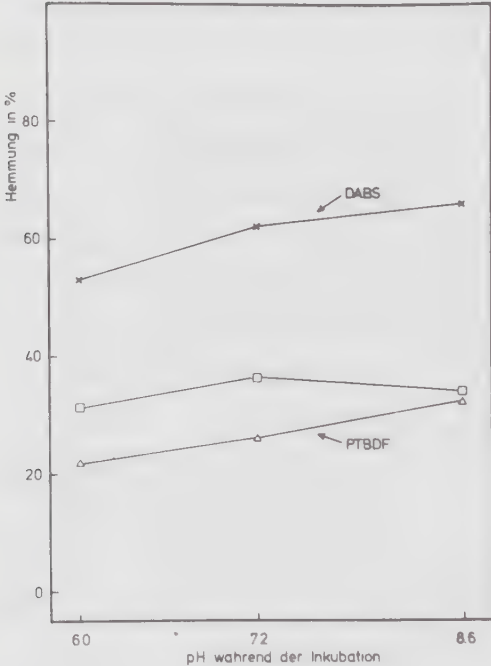


Abb. 7: Hemmung der Redoxreaktion $\text{DAD/Ascorbat} \rightarrow \text{NADP}$ durch DABS und PTBDF bei unterschiedlichen pH-Werten während der Modifikation

□ — □ : Differenz der Hemmung

Inkubationsbedingungen: Chloroplasten mit 1 mg Chl/ml wurden mit 2 mM DABS oder PTBDF für 1 min bei 0-4°C im Dunkeln inkubiert. Inkubationspuffer: pH 6,0: 0,05 M K-Citrat-Puffer + 0,1 M NaCl; pH 7,2: 0,05 M K-Phosphat-Puffer + 0,1 M NaCl; pH 8,6: 0,05 M K-Borat-Puffer + 0,1 M NaCl.

Testbedingungen: Die Ansätze wurden für 12 min

bei 15°C im Warburg-Apparat belichtet (siehe Material und Methoden). Das Testgemisch enthielt eine sättigende Menge exogener Reduktase.

Kontrollraten: 88 - 105 $\mu\text{Mol NADPH/mg Chl/h}$.

Soweit es die experimentellen Möglichkeiten erlauben, ist damit ausgeschlossen, daß das zweifach positiv geladene PTBDF die Reduktion von Ferredoxin durch Photosystem I deswegen weniger hemmt als DABS, weil es in geringerem Maße an den relevanten

Bereich der Membranoberfläche gebunden wird. Vielmehr sollte die verschiedene Beeinflussung der Ferredoxin-Reduktion darauf beruhen, daß durch die Bindung von DABS eine Komponente dieser Reaktionssequenz stärker beeinträchtigt wird als durch die Bindung von PTBDF.

2.2.2.b. Modifikation der energetisierten Membran (Bindung im Licht)

Isolierte Thylakoide ändern bei Belichtung Struktur und Volumen. Die Veränderungen sind elektronenmikroskopisch nachweisbar und können über die Lichtstreuung der Vesikelsuspensionen verfolgt werden. Als Ursache der Volumenänderung wird der Aufbau eines Protonengradienten über die Thylakoidmembran angenommen (Deamer et al. 1967); sie wird durch Entkoppler der Photophosphorylierung verhindert. Die angewandten Methoden lassen keine detaillierten Aussagen über Konformationsänderungen der Membran zu, die die Lage oder Struktur einzelner Komponenten der Membran verändern. Dagegen sollte es möglich sein, mit den chemischen Sonden Veränderungen der Membranoberfläche spezifisch nachzuweisen.

Hemmung der NADP-Reduktion durch Modifikation im Licht

Nach der Modifikation der Thylakoide mit den Diazoniumsalzen bei gleichzeitiger Belichtung ist die Fähigkeit der Vesikel zur NADP-Reduktion annähernd vollständig gehemmt, auch wenn DAD/Ascorbat als Elektronendonator für Photosystem I verwendet wird (Abb. 8). Diese Hemmung ist nicht auf eine völlige Hemm-

ung der Reduktase zurückzuführen, denn sie bleibt erhalten, wenn den Testansätzen nach der Modifikation eine sättigende Menge Reduktase zugegeben wird. Im Gegensatz zur Modifikation ohne Belichtung läßt sich kein Einfluß der unterschiedlichen Ladung von PTBDF und DABS nachweisen.

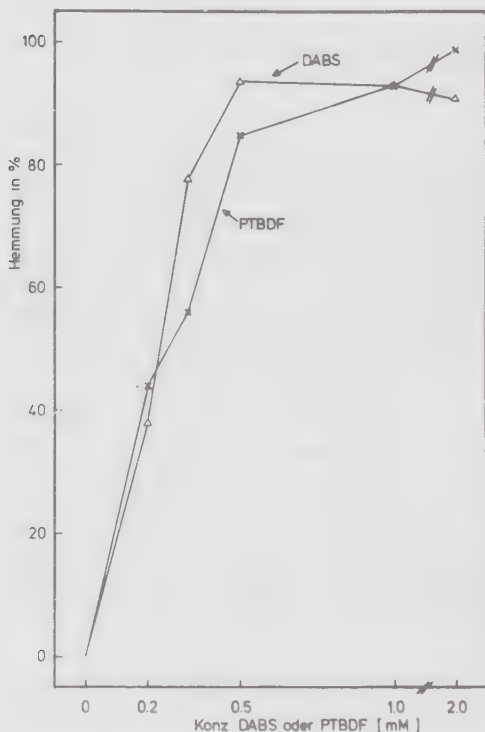


Abb. 8: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat → NADP durch DABS und PTBDF bei Modifikation im Licht

Δ—Δ: Modifikation mit DABS, x—x: Modifikation mit PTBDF

Inkubationsbedingungen: Chloroplasten mit 1 mg Chl/ml in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl wurden für 1 min unter Belichtung (Weißlicht, 2×10^5 erg/cm²/sec) bei 0-4°C mit DABS oder PTBDF inkubiert.

Testbedingungen: Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurden Küvetten mit einem Reaktionsvolumen von 1 ml für 5 min belichtet.

tet. Das Testgemisch enthielt eine sättigende Menge exogener Reduktase.

Kontrollraten: 80 -- 140 μMol NADPH/mg Chl/h.

Der Effekt der gleichzeitigen Belichtung auf die Hemmung der Reduktion von Ferredoxin (i.e. Test mit sättigender Menge exogener Reduktase) ist bei Modifikation der Thylakoide mit PTBDF

sehr drastisch: Das Ausmaß der Hemmung steigt von etwa 25 - 30% bei Inkubation im Dunkeln auf annähernd 100%. Diese fast vierfache Erhöhung der Hemmung läßt sich verhindern, wenn während der Inkubation der Thylakoide mit dem Diazoniumsalz im Licht der Elektronentransport durch DCMU gehemmt wird (Tabelle 2).

Tabelle 2: Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ NADP durch Modifikation der Thylakoide mit PTBDF

Inkubation	Elektronentransportraten			
	- exogene Reduktase $\mu\text{equ/mg Chl/h}$	Hemmung	+ exogene Reduktase $\mu\text{equ/mg Chl/h}$	Hemmung
Kontrolle - PTBDF 1' Licht	165	--	176	--
1 mM PTBDF 1' Dunkel	85	48%	134	24%
1 mM PTBDF 1' Licht	nicht meßbar	100%	13	93%
1 mM PTBDF 1' Licht 30 μM DCMU	61	63%	118	33%

Inkubationsbedingungen: Chloroplasten mit 1 mg Chl/ml in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) wurden unter den in der Legende zu Abbildung 8 angegebenen Bedingungen mit PTBDF inkubiert. Testbedingungen: Gemessen wurden im Querbeleuchtungs-Spektralphotometer die Anfangsraten der NADP-Reduktion (siehe Material und Methoden). + exogene Reduktase bedeutet die Zugabe einer sättigenden Menge von Reduktase zum Testansatz nach der Modifikation.

Wie der Einfluß von DCMU zeigt, ist die Erhöhung der Reaktivität der Sonde mit der Membran kein unmittelbarer Einfluß des

Lichtes auf das Diazoniumsalz, sondern verlangt den Elektronentransport während der Belichtung. Um entscheiden zu können, ob bei der Inkubation im Licht die Diazoniumsalze dieselbe Reaktion vollständig hemmen, die auch bei Inkubation im Dunkeln gehemmt wird, oder ob zusätzliche Reaktionen gehemmt sind, wurde die durch den Elektronentransport während der Modifikation induzierte Hemmung von Photosystem I detailliert untersucht.

Hemmung der Methylviologen-Reduktion durch Modifikation im Licht

Die Reduktion von Methylviologen wird durch die chemische Modifikation der Thylakoidmembran im Dunkeln nur geringfügig gehemmt (vergl. Tabelle 1). Die funktionellen Komponenten des Elektronentransportes, die für die Reduktion von Methylviologen nötig sind, sollten unter diesen Bedingungen für die Sonden nicht zugänglich sein oder mit ihnen überhaupt nicht reagieren können. Belichtung der Chloroplasten während der Modifikation verändert diese Situation (Tabelle 3).

Tabelle 3: Einfluß der Inkubationsbedingungen auf die Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ MV durch Modifikation der Thylakoide mit PTBDF

Inkubation	Elektronentransport $\mu\text{eq}/\text{mg Chl}/\text{h}$	Hemmung in %
Kontrolle - PTBDF	1038	--
1' Dunkel 1 mM PTBDF	1034	0
1' Licht 1 mM PTBDF	257	75
1 ' Licht 1 mM PTBDF 30 μM DCMU	879	15

Legende zu Tabelle 3:

Inkubationsbedingungen: Wie in Abb. 8.

Testbedingungen: Wie unter Material und Methoden beschrieben.

Bei Modifikation im Licht wird auch die Methylviologen-Reduktion durch Photosystem I deutlich (mit PTBDF zu 75%) gehemmt. Der Einfluß der Belichtung wird, wie bei der NADP-Reduktion (Tabelle 2), durch DCMU verhindert. Analog der NADP-Reduktion wird auch die Methylviologen-Reduktion durch DABS-Behandlung der Thylakoide im Licht in etwa gleichem Ausmaß wie durch PTBDF gehemmt (Abb. 9).

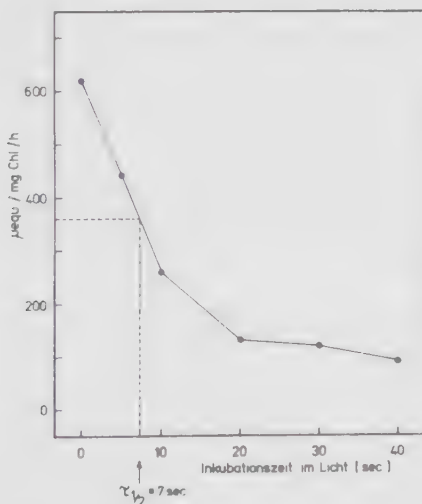


Abb. 9: Kinetik der Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ MV

durch Modifikation der Thylakoide mit DABS im Licht

Inkubationsbedingungen: Chloroplasten mit 0,6 mg Chl/ml in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl wurden mit 2 mM DABS für 2 min bei 0-4°C inkubiert. Die Chloroplastensuspensionen wurden vor der Zugabe von DABS für 15 sec vorbelichtet. Die angegebenen Belichtungszeiten sind die Belichtungszeiten nach der Zugabe von DABS. Lichtintensität: 2×10^6 erg/cm²/sec, Weißlicht.

Testbedingungen: Wie in Material und Methoden beschrieben.

Die Hemmung durch die Modifikation erfolgt schnell. Nach einer Belichtungszeit der Chloroplastensuspension während der Modifikation von 7 sec ist die Hemmung der Methylviologen-Reduktion halbmaximal.

Die Hemmung von Photosystem I, die durch den Elektronentransport während der Modifikation hervorgerufen wird, bleibt erhalten, wenn statt des Elektronendonators DAD/Ascorbat das DCPIP/Ascorbat-System verwendet wird. Auch die Reduktion von Anthrachinonsulfonat (statt Methylviologen) ist gehemmt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Beeinflussung verschiedener Photosystem I-Reaktionen durch chemische Modifikation von Thylakoiden mit DABS im Dunkeln oder im Licht

Inkubation	Donor	Elektronen-Akzeptor	Raten $\mu\text{equ/mg Chl/h}$	Hemmung
Kontrolle 1' Licht - DABS	DAD	MV	759	---
	DCPIP	MV	795	---
1' Dunkel 1 mM DABS	DAD	MV	809	0%
	DCPIP	MV	780	2%
1' Licht 1 mM DABS	DAD	MV	172	77%
	DCPIP	MV	355	55%
Kontrolle 1' Licht - DABS	DAD	MV	990	---
	DAD	AQSO_3^-	1334	---
1' Dunkel 1 mM DABS	DAD	MV	953	4%
	DAD	AQSO_3^-	1129	15%
1' Licht 1 mM DABS	DAD	MV	421	57%
	DAD	AQSO_3^-	377	72%

Inkubationsbedingungen: Wie zu Abb. 8 angegeben.

Testbedingungen: MV- und AQSO_3^- -Reduktion wurden wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen.

Da alle getesteten Photosystem I-Reaktionen gehemmt sind, kann nicht entschieden werden, ob die durch die elektronentransportabhängige Modifikation hervorgerufene Hemmung von Photosystem I auf der Elektronendonator- oder -akzeptorseite lokalisiert ist. Es wurde daher versucht, die Hemmstelle durch Fragmentierung der Thylakoidmembran mit Detergentien näher zu bestimmen. Insbesondere sollte geklärt werden, ob der endogene Elektronendonator von Photosystem I, Plastocyanin, während der Belichtung der Chloroplasten infolge einer Konformationsänderung für die Diazoniumsalze zugänglich wird und dadurch die getesteten Photosystem I-Reaktionen beeinträchtigt sind.

Digitoninfragmentierung der Thylakoidmembran nach Modifikation mit Diazoniumsalzen im Licht

Durch Digitonin-Fragmentierung isolierte Photosystem I-Partikel enthalten kein endogenes Plastocyanin. Die Photooxidation von DAD durch diese Partikel ist Kofaktor-abhängig (Elstner et al. 1967). Sie wird durch Zugabe von exogenem Plastocyanin oder von Cytochrom 552 (aus Euglena) erheblich stimuliert. Falls die Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ Methylviologen auf einer Hemmung der Redox-Reaktionen von Plastocyanin nach chemischer Modifikation der Thylakoide im Licht beruhen sollte, sollte diese Hemmung in anschließend fragmentierten Partikeln nicht mehr gefunden werden können, da hier das endogene Plastocyanin nach der Modifikation durch exogenes Plastocyanin oder einen anderen Photosystem I-Elektronendonator ersetzt wird. Die photochemischen

Aktivitäten von Photosystem I nach der Modifikation der Lamellarsysteme im Licht wurden daher vor und nach der Fragmentierung gemessen und miteinander verglichen (Tabellen 5 und 6).

Tabelle 5: Hemmung von Photosystem I-Reaktionen vor und nach Digitoninfragmentierung nach Modifikation der unfractionierten Thylakoide mit PTBDF im Licht

5 a: Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ MV

Lamellarsysteme

Kontrolle	PTBDF-behandelt	Hemmung in %
977	144	85%

Digitoninpartikel

Cyt. 552	Kontrolle	PTBDF-behandelt	Hemmung in %
--	129	119	8%
2 μ M	1806	656	64%
4 μ M	2602	985	62%

5 b: Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ NADP

Lamellarsysteme

Reduktase	Kontrolle	PTBDF-behandelt	Hemmung in %
--	132	nicht messbar	100%
0,1 ml	154	nicht messbar	100%

Digitoninpartikel

Cyt. 552	Kontrolle	PTBDF-behandelt	Hemmung in %
--	17	nicht messbar	100%
2 μ M	165	9	95%
4 μ M	290	17	94%

Tabelle 6: Hemmung von Photosystem I-Reaktionen vor und nach Digitoninfragmentierung nach Modifikation der unfractionierten Thylakoide mit DABS im Licht

6 a: Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ MV

Lamellarsysteme

Kontrolle	DABS-behandelt	Hemmung in %
1434	626	56%

Digitoninpartikel

Cyt. 552	Kontrolle	DABS-behandelt	Hemmung in %
--	214	150	29%
2 μ M	1819	862	52%
4 μ M	2780	1265	54%

6 b: Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ NADP

Lamellarsysteme

Reduktase	Kontrolle	DABS-behandelt	Hemmung in %
--	223	10	95%
0,1 ml	378	10	97%

Digitoninpartikel

Cyt. 552	Kontrolle	DABS-behandelt	Hemmung in %
--	15	5	66%
2 μ M	393	11	96%
4 μ M	575	16	97%

Die Elektronentransportraten sind in μ equ/mg Chl/h angegeben.
 Legende zu den Tabellen 5 und 6:
 Inkubationsbedingungen: Die Thylakoide wurden unter den Bedingungen mit den Diazoniumsalzen inkubiert, die in der Legende zu

Abb. 8 angegeben sind.

Testbedingungen: siehe Material und Methoden; die NADP-Reduktion wurde in 1 ml-Küvetten nach einer Belichtungszeit von 4 min gemessen, das Testgemisch enthielt sättigende Mengen exogener Reduktase.

Die Tabellen zeigen deutlich, daß sowohl im Fall der Modifikation der Membran mit DABS als auch mit PTBDF die Hemmung des Elektronentransportes durch Photosystem I nach der Fragmentierung nicht aufgehoben ist. Die Versuche können nicht ausschließen, daß die Funktion des endogenen Plastocyanin durch die Diazoniumsalzbehandlung beeinträchtigt worden ist. Die limitierende Hemmstelle ist jedoch auch Ergebnis der Modifikation der Akzeptorseite von Photosystem I oder mit dem Reaktionszentrum von Photosystem I identisch. Das Reaktionszentrum selber oder bestimmte Komponenten auf der Akzeptorseite von Photosystem I sollten daher im energetisierten Zustand der Membran mit den Proben reagieren können, nicht aber, oder jedenfalls nicht in einer Weise, die zu einer Hemmung führt, wenn die Modifikation ohne gleichzeitige Belichtung durchgeführt wird.

Falls die durch den Elektronentransport während der Modifikation verursachte Hemmung von Photosystem I darauf beruht, daß im Licht zusätzliche reaktive Gruppen den Diazoniumsalzen exponiert sind, sollte man erwarten, diese Gruppen auch durch ein Aufbrechen der Membranstruktur exponieren zu können, sodaß dann keine Lichtabhängigkeit der Modifikation mehr besteht. Daher wurden durch Digitonin-Fragmentierung isolierte Photosystem I-Partikel mit Diazoniumsalzen im Dunkeln inkubiert und die Hemmung des Elektronentransportes bestimmt.

Modifikation von Digitonin-fragmentierten Photosystem I-Partikeln mit DABS (im Dunkeln)

Digitonin-Fragmente von Photosystem I wurden ohne Belichtung mit DABS modifiziert und die durch die Modifikation verursachte Hemmung sowohl der NADP-Reduktion als auch der Methylviologen-Reduktion durch Vergleich mit Kontrollpartikeln gemessen. Ueberaschenderweise ist die Funktion der Partikel durch die Behandlung weniger beeinträchtigt als nach Inkubation unfragmentierter Membranen mit DABS im Licht (Abb. 10).

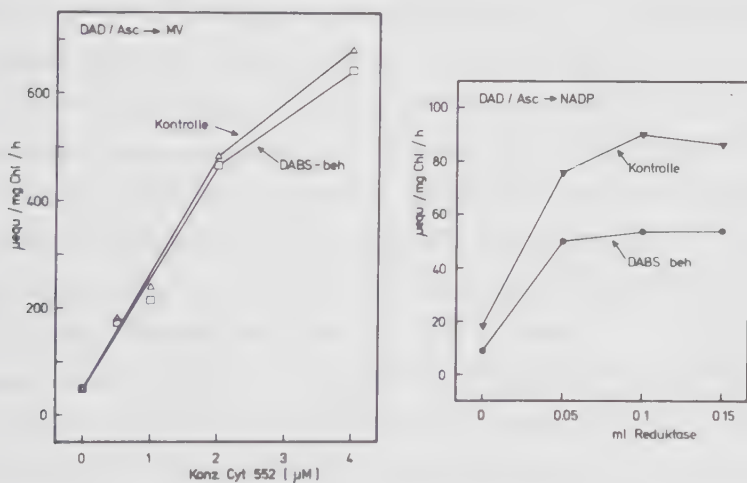


Abb. 10: Einfluss von DABS-Behandlung von Digitonin-Partikeln (im Dunkeln) auf deren Photosystem I-Reaktionen

Inkubationsbedingungen: Digitoninpartikel mit einer Chlorophyll-Konzentration von 1 mg Chl/ml in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl wurden mit 1 mM DABS für 1 min bei 0-4°C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5-faches Verdünnen mit Inkubationspuffer, der 10 mg/ml RSA enthält, abgestoppt. Nach 45-minütiger Zentrifugation bei 200 000 x g wurden die Partikel in 0,02 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und getestet. Die Kontrollpartikel wurden in der gleichen Weise, je-

doch ohne Inkubation mit DABS behandelt.

Testbedingungen: siehe Material und Methoden. Die NADP-Reduktion wurde in 1 ml-Küvetten nach einer Belichtungszeit von 8 min gemessen. Das Testgemisch enthielt 4 μM Cytochrom 552 aus Euglena.

Wie Abb. 10 zeigt, ist die Methylviologen-Reduktion nicht oder nur geringfügig gehemmt, die NADP-Reduktion aber zu 50%. Dies entspricht etwa der Hemmung dieser Reaktionen bei Modifikation intakter Lamellarsysteme mit DABS im Dunkeln. Die NADP-Reduktion in den Digitonin-Fragmenten ist fast völlig von der nachträglichen Zugabe von Reduktase abhängig. (So vervielfacht in diesem Versuch die Zugabe von exogener Reduktase die Rate der NADP-Reduktion.) Dies unterstreicht, daß die Hemmung der NADP-Reduktion durch die chemische Modifikation eine Hemmung der Reduktion von Ferredoxin darstellt und nicht eine unvollständige Aufhebung der Hemmung der endogenen, membrangebundenen Reduktase durch die Zugabe der exogenen Reduktase. Da die Modifikation von Digitoninpartikeln die Modifikation intakter Lamellarsysteme im Licht offenbar nicht simuliert, kann das Ergebnis dahingehend interpretiert werden, daß auch bei den Lamellarsystemen die Hemmung der membrangebundenen Reduktase durch die Zugabe von Reduktase zum Testansatz aufgehoben wird und die verbleibende Hemmung eine Hemmung der Ferredoxin-Reduktion ist.

2.2.3. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.2.

Chemische Modifikation der Oberfläche der Thylakoidmembran mit impermeablen Diazoniumsalzen hat eine Hemmung der Reduktion von NADP durch Photosystem I zur Folge. Die Reduktion von

Methylviologen und Anthrachinonsulfonat wird nur geringfügig beeinträchtigt, wenn die Modifikation im Dunkeln durchgeführt wird. Für das Diazoniumsalz DABS konnten damit auch quantitativ die Ergebnisse von Selman et al. (1974) bestätigt werden. Der Vergleich mit dem anders geladenen Diazoniumsalz PTBDF zeigt, daß diese Hemmung nicht für DABS spezifisch ist. Bei prinzipiell gleichen qualitativen Ergebnissen unterscheidet sich der Einfluß der Bindung beider Proben nur im Ausmaß der Hemmung.

Die chemische Modifikation der Thylakoide beeinträchtigt die Funktion der membrangebundenen Ferredoxin-NADP-Reduktase in der NADP-Reduktion. Die bei Umgehung dieser Hemmstelle (durch Zugabe reiner Reduktase) verbleibende Hemmung ist auf eine Hemmung der Reduktion von Ferredoxin durch Photosystem I zurückzuführen. Das Ausmaß dieser Hemmung ist nach DABS- und PTBDF-Behandlung der Membran verschieden. Variation der Inkubationsparameter beeinflusst die Unterschiede nicht. Dies kann dahingehend interpretiert werden, daß nicht eine unterschiedliche Bindung der Proben, sondern ein unterschiedlicher Einfluß der in gleichem Ausmaß gebundenen Proben vorliegt.

Das gebundene DABS führt aufgrund seiner Sulfonat-Gruppe negative Ladungen in die Membranoberfläche ein, PTBDF aufgrund seiner Trimethylammonium-Gruppe positive Ladungen. Es ist denkbar, daß die negativen Ladungen im Falle von DABS zu einer stärkeren Abstossung des negativ geladenen Ferredoxins führen und DABS deshalb seine Reduktion stärker hemmt als PTBDF.

Zur Untersuchung der Membranoberfläche im energetisierten Zustand der Thylakoidmembran wurde die Modifikation bei gleichzeitiger Belichtung durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Selman et al. (1974) mit DABS-Behandlung hemmt

auch PTBDF bei Vorinkubation der Thylakoide mit dem Diazoniumsalz im Licht die Reduktion von Ferredoxin durch Photosystem I zu annähernd 100%. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Autoren hemmen jedoch sowohl DABS als auch PTBDF unter den angewandten Bedingungen den Elektronentransport zu Methylviologen deutlich (70-80%). Auch diese lichtinduzierte Hemmung kann wie die Erhöhung der Hemmung der Ferredoxin-Reduktion durch Unterbindung des Elektronentransportes während der Modifikation im Licht durch DCMU verhindert werden, d.h. photosynthetischer Elektronentransport während der Vorinkubation verursacht die veränderte Hemmung durch die Modifier. Da Methylviologen- und Anthrachinonsulfonat-Reduktion gehemmt werden, ist die Hemmstelle, die bei Modifikation im Licht auftritt, nicht mit der Hemmstelle identisch, die bei Inkubation im Dunkeln gefunden wird. Sie ist vielmehr im Elektronentransport vor der Hemmstelle der Modifikation im Dunkeln lokalisiert. Da die durch den Elektronentransport während der Inkubation verursachte Hemmung der Methylviologen-Reduktion bei anschließender Digitonin-Fragmentierung der modifizierten Thylakoidmembran erhalten bleibt, ist diese Hemmung wahrscheinlich nicht auf eine Modifikation des endogenen Elektronendonors von Photosystem I, Plastocyanin, zurückzuführen. Es ist anzunehmen, daß das Reaktionszentrum von Photosystem I oder eine weitere Komponente auf der Akzeptorseite von Photosystem I in ihrer Funktion beeinträchtigt worden sind.

Die Modifikation isolierter Photosystem I-Fragmente beeinträchtigt deren Funktion nicht in derselben Weise wie die Modifikation der gesamten Thylakoidmembran im Licht. Es muß daher

ein spezifischer Effekt des Elektronentransportes während der Inkubation diese Hemmung verursacht haben. Die Ergebnisse lassen sich nicht durch die Annahme erklären, daß Photosystem I im aktiven Zustand gegenüber den Modifiern in größerem Ausmaß exponiert ist als im Dunkeln, sondern daß es den Proben in einer anderen Konformation exponiert ist. Eine solche Hypothese wurde von Giaquinta et al. (1974 a,b, 1975) aufgestellt, um den Einfluß chemischer Modifikation durch DABS auf Teilreaktionen des Elektronentransportes in Photosystem II zu erklären.

Derartige Untersuchungen mit chemischen Proben müssen sicherstellen, daß die Bedingungen, unter denen eine Konformationsänderung der Membran mit den Modifiern nachgewiesen werden soll, die Reaktivität der Modifier selber nicht beeinflussen. Ein direkter Einfluß der Belichtung auf die Diazoniumsalze konnte ausgeschlossen werden, da der Elektronentransporthemmstoff DCMU alle lichtinduzierten Effekte unterbindet. Die verbleibende Möglichkeit ist eine Veränderung der Reaktivität der Diazoniumsalze durch die durch Chloroplasten im Licht erzeugten Reduktionsäquivalente. Sie wird im folgenden Kapitel untersucht.

2.3. Einfluß des Elektronentransportes auf die Reaktivität der Diazoniumsalze

Dilley und Mitarbeiter haben bei ihrer Untersuchung des lichtabhängigen Einflusses von Modifikation mit DABS auf Photosystem II gegenüber der Dunkelinkubation eine Erhöhung der Bindung der Sonde an das gesamte Membransystem beobachtet (Giaquinta

et al. 1973, 1974 a), die sie auf eine Konformationsänderung der Membran im Licht zurückführten. Alternativ läßt sich vermuten, daß unter den Bedingungen die chemische Reaktivität der Sonde gegenüber dem Membransystem erhöht worden ist. Es wurde darum versucht, das Entstehen einer reaktiven Verbindung aus den Diazoniumsalzen bei Inkubation mit Chloroplasten im Licht nachzuweisen.

2.3.1. Reduktion von Diazoniumsalzen durch Chloroplasten im Licht

Die Belichtung einer Chloroplastensuspension, die DABS enthält, führt zu einer Sauerstoffaufnahme (Abb. 11).

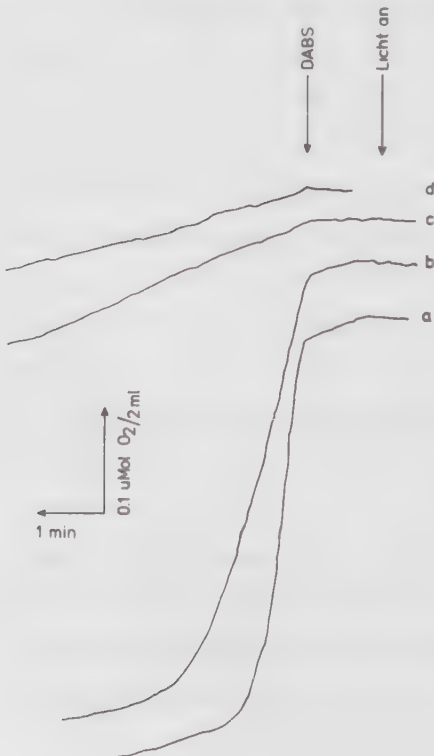


Abb. 11: Änderung der Sauerstoffkonzentration in der Reaktionsmischung während der Inkubation belichteter Chloroplasten mit DABS

- a: ohne Zusätze
- b: + 1 µM DBMIB
- c: + 10 µM DCMU
- d: wie a, jedoch im Dunkeln

Gezeigt sind Schreibernitschriften der Messung mit der Sauerstoffelektrode. Reaktionsbedingungen: Die Reaktionsmischung enthielt in 2 ml 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2):

0,1 M NaCl und Chloroplasten mit 0,4 mg Chl. Wie angezeigt, wurde zuerst das Licht angeschaltet und dann 0,5 μ Mol DABS mit einer Spritze zugegeben.

Die Anfangsrate in a nach Zugabe von DABS beträgt 110 μ Mol O_2 aufgenommen/ mg Chl/h.

Belichtet wurde mit Weißlicht (2×10^5 erg/cm²/sec), T=20°C.

Der Reaktionsansatz dieses Versuches enthielt nur Chloroplasten, Puffer und DABS. Eine Hemmung des Elektronentransportes durch DBMIB (Abb. 11, b) hemmt die Geschwindigkeit der O_2 -Aufnahme zu etwa 70%, DCMU zu 96% (Abb. 11, c). Ohne Belichtung (Abb. 11, d) läßt sich eine langsame Sauerstoffaufnahme messen, deren Rate etwa der entspricht, die im Licht in Anwesenheit von DCMU beobachtet wird. Die schnelle Sauerstoffaufnahme der belichteten Chloroplastensuspension in Abb. 11, a (Anfangsgeschwindigkeit 110 μ Mol O_2 aufgenommen/mg Chl/h) wird also durch den photosynthetischen Elektronentransport während der Inkubation verursacht. Der Versuch kann nicht klären, ob die Sauerstoffaufnahme auf einer Veränderung von DABS durch den Elektronentransport beruht oder ob eine Veränderung der Membran durch die Probe zu einer Erhöhung der Autoxidabilität von Elektronentransportkomponenten führt.

Eine Sauerstoffaufnahme läßt sich auch messen, wenn man DABS zu einer Lösung von K-Ferrocyanid (oder von anderen Reduktionsmitteln) gibt (Abb. 12). Das Ausmaß der Sauerstoffaufnahme nimmt mit steigender Menge DABS zu. Gleichzeitig färbt sich die Lösung gelb, was auf eine Oxidation des Ferrocyanid zu Ferricyanid hindeutet. Das entstehende Absorptionsspektrum ist jedoch kein reines Ferricyanidspektrum, diesem sind Absorptionsspektren von weiteren Reaktionsprodukten (vermutlich von DABS) überlagert. Die Zunahme der Absorption der Lösung konnte daher

nicht direkt zur quantitativen Bestimmung des entstehenden Ferricyanid herangezogen werden.

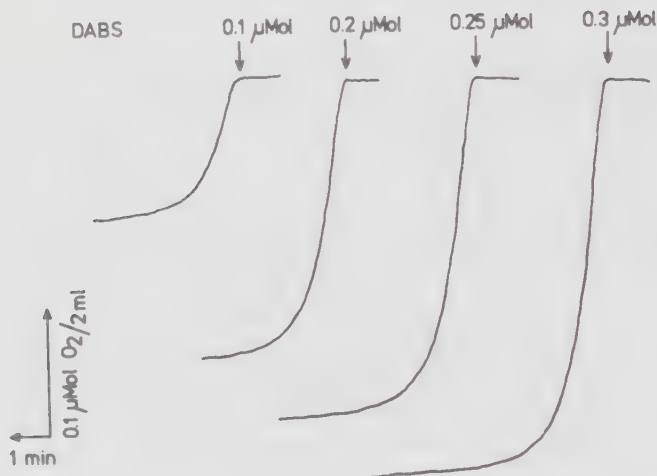


Abb. 12: Sauerstoffaufnahme bei Reaktion von DABS mit K-Ferrocyanid

Gezeigt sind Schreibermitschriften der Messung mit einer Sauerstoffelektrode.

Reaktionsbedingungen: Die Reaktionslösungen enthielten in 2 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl und 2 μMol K-Ferrocyanid. Zu den angegebenen Zeiten wurde DABS mit einer zu der gerührten Reaktionslösung gegeben. T=20°C.

Der Sauerstoffverbrauch bei Reaktion von DABS mit K-Ferrocyanid ist mit der Menge des zugegebenen DABS quantitativ korrelierbar (Abb. 13). Aus der Titration errechnet sich eine Stöchiometrie von 1,05 Mol O₂ aufgenommen/ Mol DABS zugegeben.

Die Sauerstoffaufnahme bei Inkubation von Chloroplasten mit DABS im Licht ist ebenfalls von der Menge des Diazoniumsalzes abhängig. Die Titration (Abb. 13) ergibt eine Stöchiometrie

von 0,8 Mol O_2 aufgenommen/ Mol DABS zugegeben.

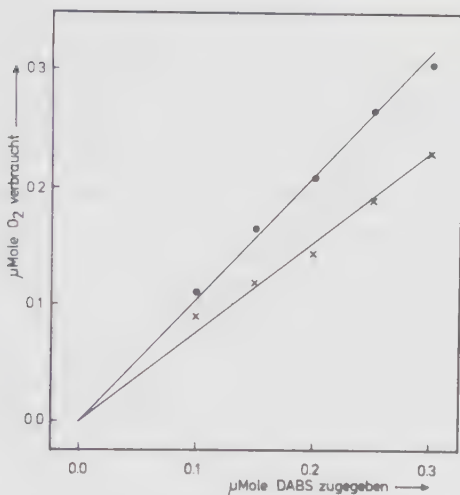


Abb. 13: Sauerstoffaufnahme als Funktion der Menge von DABS bei Inkubation von DABS mit K-Ferrocyanid oder mit Chloroplasten im Licht

●—●: Reaktion mit K-Ferrocyanid

x—x: Reaktion mit Chloroplasten im Licht

Reaktionsbedingungen: Für die Reaktion mit K-Ferrocyanid enthielten die Reaktionslösungen in 2 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl, 2 μ Mol K-Ferrocyanid und die angegebenen Mengen DABS. Für die Reaktion mit Chloroplasten im Licht enthielten die Reaktionslösungen in 2 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl, Chloroplasten mit 0,2 mg Chl und die angegebenen Mengen DABS. Belichtung: Weißlicht mit einer Intensität von etwa 2×10^5 erg/cm²/sec. T=20°C. Die Sauerstoffaufnahme wurde mit der Sauerstoffelektrode gemessen.

Die Ergebnisse legen nahe, eine Reduktion von DABS durch K-Ferrocyanid oder durch Chloroplasten im Licht anzunehmen, die das Entstehen einer autoxidablen Substanz zur Folge hat. Eine Bildung von H_2O_2 während dieser Oxidation ließ sich mit Katalase nicht nachweisen.

Diazoniumsalze können mit Reduktionsmitteln wie hypophosphoriger Säure reduziert werden (vergl. z. B. Morrison und Boyd 1971, S. 778). Die Diazoniumgruppe wird dabei als N_2 frei, die Kupplungsfähigkeit geht verloren. Die Freisetzung eines Gases konnte unter den angegebenen Bedingungen bei chemischer Reduktion von DABS nachgewiesen werden. Unter anaeroben Bedingungen, um die Sauerstoffaufnahme zu vermeiden, läßt sich die Entwicklung eines Gases manometrisch messen (Abb. 14).

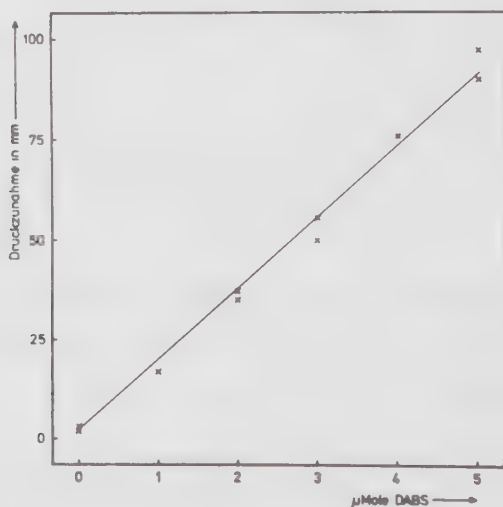


Abb. 14: Manometrische Messung des bei chemischer Reduktion von DABS freigesetzten Gases

Als Druckzunahme ist die Höhe einer Säule von Brodie-Lösung in mm aufgetragen.
Reaktions- und Messbedingungen: Die Messung wurde in einem Warburg-Apparat bei $T=15^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Gefäße enthielten im Hauptgefäß in 2,8 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl und die angegebenen Mengen DABS. Die Ansatzbirne enthielt in 0,2 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl und 10 µMol K-Ferrocyanid. Die Gefäße wurden 5 min mit N_2 begast und dann die Reaktion durch Kippen gestartet. Die Druckzunahme wurde abgelesen, nachdem sich Druckkonstanz eingestellt hatte.

Unter der Annahme, daß das entstehende Gas N_2 ist, kann aus dem Versuchsergebnis eine Stöchiometrie von 0,92 Mol N_2 entwickelt/Mol DABS zugegeben berechnet werden. Wegen der relativ geringen Empfindlichkeit der manometrischen Methode war es nicht möglich, auf diese Art die Freisetzung eines Gases bei Inkubation von Chloroplasten mit einem Diazoniumsalz im Licht quantitativ zu bestimmen. Die für eine genaue Bestimmung notwendigen hohen Konzentrationen bei relativ geringen Chlorophyllkonzentrationen hemmen wahrscheinlich den Elektronentransport der Chloroplasten im Licht zu stark. Qualitativ ließ sich auch in diesem Versuch eine Gasentwicklung feststellen, wenn unter anaeroben Bedingungen gearbeitet wurde (nicht gezeigt).

Der Verlust der Diazoniumgruppe bei Inkubation von DABS mit Chloroplasten im Licht konnte auf eine andere Weise direkt gemessen werden. Als Bestimmungsmethode wurde eine Kupplungsreaktion des Diazoniumsalzes verwendet. Das Kupplungsreagenz, α -Naphthylamin, kuppelt mit Diazoniumsalzen zu einem Azofarbstoff, der bei niedrigem pH eine rote Farbe hat und spektralphotometrisch gemessen werden kann. Mit dieser Reaktion läßt sich die Konzentration eines Diazoniumsalzes in Lösung quantitativ bestimmen. Die Methode ist wegen des hohen Extinktionskoeffizienten des gebildeten Azofarbstoffes ($\epsilon_{530 \text{ nm}} = 45 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ mit DABS als Diazoniumsalz) sehr empfindlich.

Wird eine Chloroplastensuspension, die ein Diazoniumsalz enthält, belichtet, so nimmt die Konzentration des kupplungsfähigen Diazoniumsalzes rasch ab (Abb. 15). Die Geschwindigkeit der Zerstörung des Diazoniumsalzes während der ersten 10 sec der Belichtung beträgt (in Abb. 15) $240 \mu\text{Mol DABS zerstört/mg Chl/h}$. Mit zunehmender Belichtungszeit wird die Reaktion langsamer,

wahrscheinlich aufgrund der Hemmung des Elektronentransportes durch die Probe.

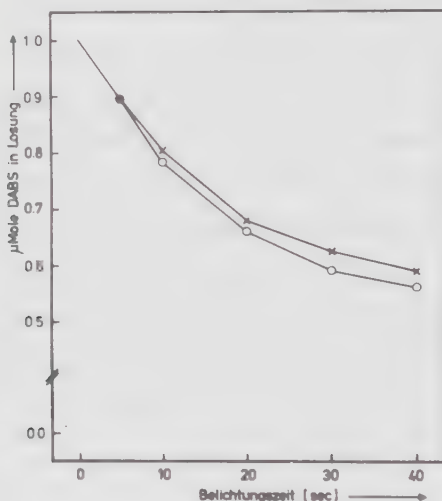


Abb. 15: Zerstörung von DABS durch Chloroplasten im Licht

o—o: unter aeroben, x—x: unter anaeroben Bedingungen

Die quantitative Bestimmung von DABS in Lösung erfolgte durch Kupplung mit α -Naphthylamin (siehe Material und Methoden)

Reaktionsbedingungen: Die Reaktionsmischungen enthielten in 2 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl, Chloroplasten mit 0,26 mg chl und 1 μ Mol DABS. 5 sec nach der Zugabe von DABS zu der gerührten Reaktionsmischung wurden die Proben für die angegebenen Zeiten mit Weißlicht (2×10^5 erg/cm²/sec) beleuchtet. 1 min nach der Zugabe von DABS wurden Aliquots entnommen und mit der α -Naphthylamin-Lösung gemischt. Anaerobe Bedingungen wurden durch Begasen der Reaktionslösung vor der Zugabe von Chloroplasten mit N₂ erzeugt. Nach der Zugabe der Chloroplasten wurde die Oberfläche des Reaktionsgemisches mit N₂ gespült. Die anaeroben Bedingungen wurden mit der Sauerstoffelektrode geprüft. T=20°C.

Der Zeitverlauf der Zerstörung unter aeroben und anaeroben Verhältnissen ist annähernd identisch, weil die O₂-Aufnahme des reduzierten Reaktionsproduktes eine Folgereaktion ist. Es gelingt, die O₂-Aufnahme bei Reduktion von DABS mit Chloroplasten

direkt mit der Zerstörung des Diazoniumsalzes zu korrelieren (Abb. 16). Auch diese Bestimmung ergibt, wie die in Abb. 13 dargestellte, eine Stöchiometrie von 0,8 O₂ aufgenommen/ 1 DABS zerstört.

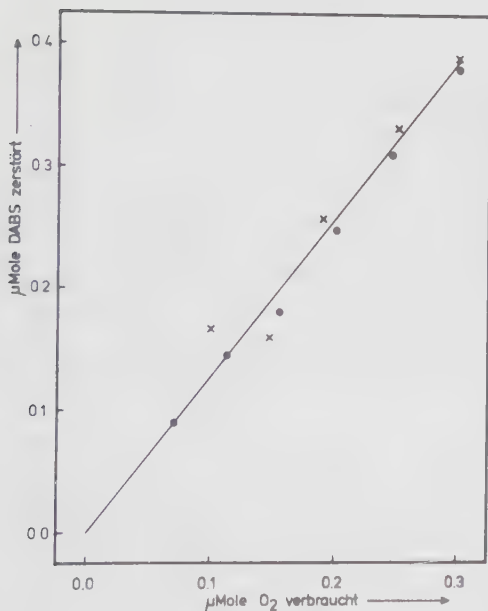


Abb. 16: Korrelation von DABS-Zerstörung und O₂-Aufnahme bei Inkubation mit belichteten Chloroplasten

Reaktionsbedingungen:
Die Reaktionsmischungen enthielten in 2 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl, Chloroplasten mit 0,2 mg Chl und 1 μMol DABS. 10 sec nach der Zugabe von DABS zu der gerührten Reaktionsmischung wurden die Proben für verschiedene Zeiten mit Weißlicht (2×10^5 erg/cm²/sec) belichtet. Nach einer Gesamtinkubationsdauer von 2 min wurde die Sauerstoffaufnahme mit der Sauerstoffelektrode gemessen und Aliquots mit der α-Naphthylamin-Lösung gemischt. Die Zer-

störung von DABS wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, als Verlust an Kupplungsfähigkeit mit α-Naphtylamin gemessen. Die aufgetragenen Werte stammen aus zwei unabhängigen Versuchen. T=20°C.

Damit ist gezeigt, daß Chloroplasten photosynthetisch Diazoniumsalze mit Anfangsraten, die einer üblichen Hill-Reaktion entsprechen, reduzieren können. Die Reduktion benötigt keinen Sauerstoff. Die Sauerstoffaufnahme unter aeroben Bedingungen

beruht auf der Reaktion eines Intermediärproduktes der Reduktion mit O_2 , wobei annähernd 1 O_2 pro reduziertem DABS aufgenommen wird (Reduktion mit K-Ferrocyanid). Bei Reduktion mit belichteten Chloroplasten beträgt dieses Verhältnis wegen der Sauerstoffentwicklung in der Wasserspaltungsreaktion 0,8 O_2 pro DABS reduziert. Legt man der Reduktion von DABS einen 1-Elektronenschritt zugrunde, so läßt sich aus

1. Wasserspaltung: $1/4 O_2$ pro 1 Elektron (entwickelt)

2. DABS-Reduktion: 1 O_2 pro 1 Elektron (aufgenommen)

für aerobe Bedingungen eine Stöchiometrie von 0,75 O_2 aufgenommen/1 DABS reduziert berechnen. Dieser Wert ist nahe dem gemessenen (0,8 O_2 /DABS reduziert). Legt man der Reduktion von DABS einen 2-Elektronenschritt zugrunde, dann errechnet sich in der gleichen Weise eine Stöchiometrie von 0,5 O_2 aufgenommen/DABS reduziert. Dieser Wert ist mit der gemessenen Stöchiometrie unvereinbar.

2.3.2. Korrelation der photosynthetischen Reduktion von DABS mit der lichtabhängigen Bindung der Probe an die Thylakoidmembran

Dilley und Mitarbeiter haben die durch den Elektronentransport während der Modifikation verursachte Bindung von ^{35}S -DABS an die Thylakoidmembran in Abhängigkeit von den Inkubationsparametern detailliert untersucht. Bedingungen, die auch eine Reduktion von DABS zulassen, führen zu einer gegenüber der Bindung ohne Belichtung 3-4-fach erhöhten Bindung der Probe an die Membran. DBMIB hemmt diese Bindung teilweise, DCMU annähernd vollständig, während Entkoppler sie leicht stimuliert

(Giaquinta et al. 1973, Giaquinta et al. 1974a, b, Giaquinta und Dilley 1974c).

Ein derartiger Einfluß der Inkubationsbedingungen würde auch erwartet werden, wenn die erhöhte Bindung auf der Bildung einer reaktiven Komponente durch eine Photoreduktion des Diazoniumsalzes beruht.

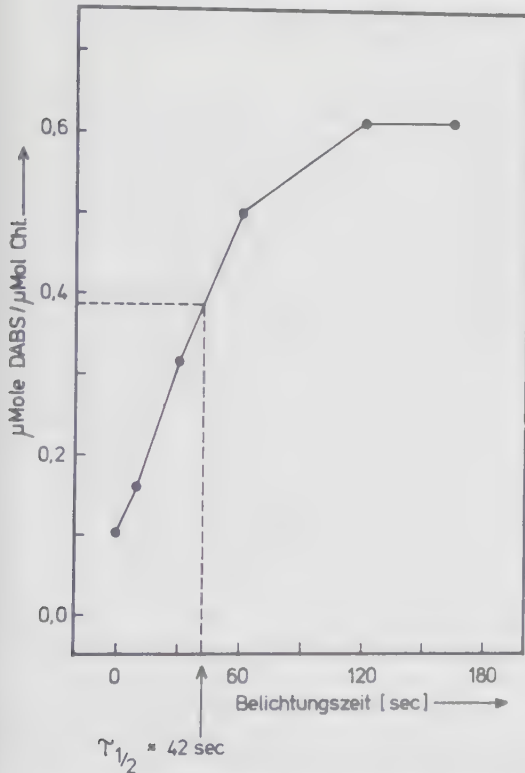


Abb. 17: Zeitverlauf
der lichtabhängigen
DABS-Bindung an die
Thylakoidmembran

Inkubationsbedingungen: Das Inkubationsgemisch enthielt in 2 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl, 2 mM DABS und Chloroplasten mit 1 mg Chl. Die Inkubationsansätze wurden für die angegebenen Zeiten mit Weißlicht (2×10^6 erg/cm²/sec belichtet. Die Gesamtinkubationsdauer betrug 3 min. T= 0°C.

Abb. 17 zeigt den Zeitverlauf der lichtabhängigen Bindung der ³⁵S-markierten Probe an die Thylakoidmembran. Bei konstanter Gesamtinkubationsdauer wurde die Belichtungszeit der Chloroplastensuspensionen variiert.

Ohne Belichtung wurde etwa 0,1 $\mu\text{Mol DABS}/\mu\text{Mol Chl}$ gebunden. Durch Belichten des Inkubationsgemisches wird bis über 0,6 μMol

DABS/ μ Mol Chl gebunden (in verschiedenen Versuchen 2-5% des insgesamt vorhandenen DABS). Die Halbwertszeit der Bindung im Licht beträgt ca. 42 sec. Sie ist damit wesentlich größer als die Halbwertszeit für die Hemmung der Reduktion von Methylviologen unter vergleichbaren Bedingungen (7 sec, vergl. Abb. 9), d.h. die Hemmung der Methylviologen-Reduktion ist nicht proportional der Bindung der Probe an das gesamte Membransystem.

Da in dem Versuch, in dem der Zeitverlauf der Hemmung der Methylviologen-Reduktion gemessen wurde, und in dem Versuch, in dem der Zeitverlauf der Bindung von DABS an die Membran gemessen wurde, ein prinzipiell gleiches Inkubationsprotokoll verwendet wurde, sollte die schnelle Hemmung des Elektronentransportes zu einer etwa gleichschnellen Hemmung der lichtabhängigen Bindung des Reagenzes führen, falls die Bindung auf der Reduktion von DABS durch den Elektronentransport der Chloroplasten während der Inkubation beruht. Dies ist nicht der Fall. Gleichzeitig mit der Belichtung der Lamellarsysteme in Anwesenheit von DABS wird jedoch die Inkubationslösung wegen der DABS-abhängigen O_2 -Aufnahme zunehmend anaerob (vergl. Abb. 11). Die unterschiedlichen Kinetiken von Hemmung und Bindung könnten darauf beruhen, daß mit anaeroben Bedingungen die lichtabhängige Bindung der Probe an die Membran beschleunigt ist, weil die Konkurrenzreaktion mit O_2 ausgeschlossen wird.

In der Tat beschleunigen anaerobe Bedingungen während der Modifikation im Licht die Bindung von DABS an die Membran (Abb. 18). Die Geschwindigkeit der Bindung wird durch anaerobe Inkubation etwa verdreifacht, während die Geschwindigkeit

der Hemmung der Methylviologen-Reduktion der unter aeroben Inkubationsbedingungen gleicht. Da die Reduktion von DABS

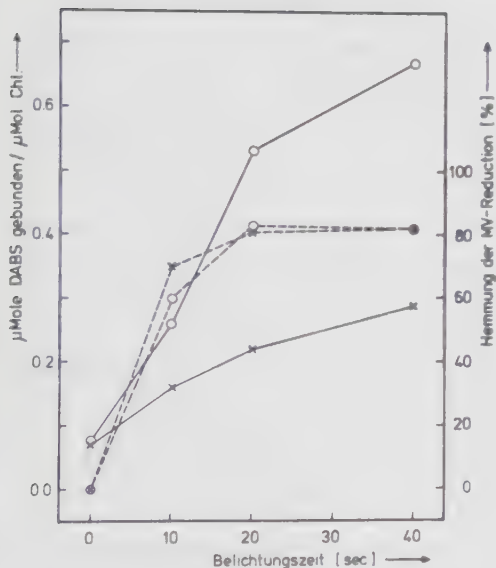


Abb. 18: Zeitverlauf der lichtabhängigen DABS-Bindung an die Thylakoidmembran und der Hemmung der MV-Reduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen

—: Bindung der Probe:
 x—x, unter aeroben,
 o—o, unter anaeroben Inkubationsbedingungen.
 ---: Hemmung der MV-Reduktion: x---x, Inkubation unter aeroben, o---o

unter anaeroben Bedingungen.

Die Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ MV wurde wie in Material und Methoden beschrieben gemessen. Inkubationsbedingungen: Das Inkubationsgemisch enthielt in 3 ml: 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 M NaCl, 2 mM DABS und Chloroplasten mit 0,8 mg Chl. Anaerobe Bedingungen während der Inkubation wurden wie in der Legende zu Abb. 15 beschrieben erzeugt. Die Inkubationsmischungen wurden für die angegebenen Zeiten mit Weißlicht von $2 \times 10^6 \text{ erg/cm}^2/\text{sec}$ belichtet. Die Gesamtinkubationsdauer von Chloroplasten und DABS war 2 min, $T = 20^\circ\text{C}$.

durch Chloroplasten unter anaeroben Bedingungen nicht beschleunigt ist. (Abb. 15), muß die erhöhte Bindungsgeschwindigkeit

keit auf einer erhöhten Effizienz der Bindung unter anaeroben Verhältnissen beruhen. Sie führt zu einer annähernd 10-fachen Erhöhung der Bindung der Probe an die Membran bei Belichtung (Abb. 18).

Es gibt keinen plausiblen Grund anzunehmen, daß anaerobe Bedingungen die Geschwindigkeit einer Azo-Kupplung erhöhen, zumal ohne Belichtung die Bindung der Probe an die Membran durch O_2 nicht beeinträchtigt wird. Da die Bindung von DABS an die Membran mithilfe der Radioaktivität der ^{35}S -markierten Probe gemessen wurde, ist diese Bestimmung nicht spezifisch für die Bindung durch Azo-Kupplung. Für eine Bindung der Probe im Licht über einen Reaktionsmechanismus, der nicht die Azo-Kupplung ist, spricht folgendes:

Chloroplasten reduzieren DABS. Die reduzierte Form des Diazoniumsalzes reagiert unter aeroben Bedingungen mit O_2 . Nimmt man an, daß die reduzierte Form des Diazoniumsalzes mit der Membran reagieren kann, so stellt die Reaktion mit O_2 eine Seitenreaktion dar, die mit der Bindung an die Membran konkurriert. Infolgedessen ist im Licht die Bindung der Probe an die Membran in Abwesenheit von O_2 erhöht.

Die lichtinduzierte Hemmung der Methylviologen-Reduktion durch DABS ist mit der lichtinduzierten Bindung der Probe nicht korreliert. Die zur Hemmung führende Bindung kann deshalb durch einen anderen Prozeß als durch die Aktivierung der Probe infolge Reduktion verursacht worden sein. Die Hemmung setzt wahrscheinlich eine spezifische Bindung des Modifiers voraus, während die Bindung der Probe unspezifisch an die gesamte Membran erfolgen kann. Die Hemmung kann eine Folge der Aktivierung des Diazoniumsalzes sein, wenn aerobe Bedingungen

diese spezifische Bindung nicht in dem Maße verlangsamen wie die Bindung an andere Bereiche der Membranoberfläche. Möglicherweise ist der Ort der Bindung, der zu einer Hemmung der Reduktion von Methylviologen durch Photosystem I mit dem Modifizier reagieren muß, in unmittelbarer Nähe des Reduktionsortes von DABS lokalisiert oder mit ihm identisch (siehe auch die Diskussion zu diesem Kapitel). Eine Konformationsänderung der Membran als Ursache dieser Hemmung kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 7: Aktivierung von DABS durch Reduktion und ihre Konsequenzen

Komponente	reagiert mit	Konsequenz
DABS (Diazoniumsalze)	Chloroplastenmembran	Bindung (Azokupplung) Teilweise Hemmung der NADP-Reduktion
"Reduzierte Form" (durch Chloroplasten im Licht erzeugt)	Chloroplastenmembran	Erhöhte Bindung Völlige Hemmung der NADP-Reduktion Hemmung der MV-Reduktion
	Molekularem Sauerstoff	Vermindert die Bindung der "reduzierten Form" der Probe an die Chloroplastenmembran

In Tabelle 7 ist die postulierte Erklärung für die lichtabhängigen Effekte der Diazoniumsalze zusammengefasst. Die Erklärung hat, im Gegensatz zu der Hypothese von Dilley und Mitarbeitern, keine Konformationsänderung der Membran, sondern

eine Veränderung der Reaktivität der Probe zur Begründung.

1.1.2. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.3.

2) Möglicher Mechanismus der Reduktion von DABS durch Chloroplasten

Die Ergebnisse des Kapitels zeigen, daß DABS (und, was nicht gezeigt wurde, auch PTBDF) durch Chloroplasten im Licht zu einer autoxidablen, aktivierten Verbindung reduziert wird. Ash et al. beschrieben 1961 die Reduktion von Azofarbstoffen durch isolierte Spinat-Chloroplasten in einer Hill-Reaktion. Diese Reduktion führt wahrscheinlich zu einer Spaltung der Azogruppe in zwei Aminogruppen (Freist 1972), eine Reduktion, die pro Molekül des Azofarbstoffes 4 Elektronen erfordert. Die in dieser Kapitel beschriebene photosynthetische Reduktion eines Diazoniumsalzes ist ein 1-Elektronenschritt. Sie kann deshalb nicht nach einem analogen Mechanismus ablaufen.

Reaktionen, die unter Reduktion von Diazoniumsalzen ablaufen, sind aus der organischen Chemie bekannt (vergl. z.B. Hückel 1961, S. 294-295). Die Diazogruppe wird dabei als N_2 abgespalten, die Reaktionen sind sauerstoffempfindlich (DeTar und Turetzky 1969). Auch für wässrige Lösungen sind sie beschrieben worden (Gardner 1969). Sie verlaufen über Arylradikale, als Reaktionsprodukte werden Biacrole gebildet, durch Reaktion mit H_2O ArH und ArOH (Ar=Aryl).

Die Reduktion von DABS durch Chloroplasten weist ähnliche Eigenschaften auf: 1-Elektronenschritt, Reaktion des Protons mit C_2 , Freisetzen der Diazoniumgruppe als N_2 . Die Annahme, daß intermediär ein Arylradikal gebildet wird, bietet

für den Mechanismus der lichtabhängigen Bindung des Reagenzes an die Thylakoidmembran eine Erklärung an: Arylradikale können mit Radikalen reagieren, aromatische Substitutionsreaktionen eingehen und an Doppelbindungen addieren. Ihre Reaktivität gegenüber O_2 erklärt die beobachtete stöchiometrische O_2 -Aufnahme (Hay 1974). In Analogie zu diesen aus der Chemie bekannten Reaktionen wird deshalb die photosynthetische Reduktion von Diazoniumsalzen zu Arylradikalen vorgeschlagen:



Wegen der Reaktion von Arylradikalen mit dem Lösungsmittel H_2O in Abwesenheit von O_2 konnte es nicht gelingen, die licht-induzierte Bindung von DABS durch chemische Reduktion des Diazoniumsalzes in Anwesenheit von Chloroplasten im Dunkeln zu simulieren. Derartige Versuche (Daten nicht gezeigt) führten zu einer maximal 20%igen Erhöhung der Bindung. Wegen der Konkurrenzreaktionen (so mit O_2 und H_2O) führt wahrscheinlich nur eine Reduktion des Diazoniumsalzes in unmittelbarer Nähe der Membranoberfläche, wie sie bei der Reduktion durch die Chloroplasten selber stattfindet, zu einer effektiven Bindung des Arylradikals an die Thylakoidmembran. Auch in diesen Versuchen wurden nur etwa 5% des gesamten eingesetzten Reagenzes gebunden. Die Reduktion des Diazoniumsalzes führt nicht zur Bildung eines unlöslichen Reaktionsproduktes, wie der Ausgang des Versuches mit chemischer Reduktion zeigt. Die gemessene Bindung stellt daher tatsächlich eine Bindung der Probe an die Thylakoidmembran dar.

b) Vergleich der Interpretation mit den Bindungsstudien von Dilley und Mitarbeitern

Bereits 1970 interpretierten Nakaya et al. die (mit einer indirekten Methode gemessene) erhöhte Bindung von Diazoniumsalzen an die Thylakoidmembran bei Modifikation im Licht als eine durch den Elektronentransport induzierte Konformations- oder Konfigurationsänderung der Membran. Dilley und Mitarbeiter begannen 1973 (Giaquinta et al. 1973) diese Effekte mit ^{35}S -markiertem DABS zu untersuchen und gleichzeitig die durch die Modifikation verursachten Hemmungen von Teilsequenzen des photosynthetischen Elektronentransportes zu studieren. Sie konnten durch Bestimmung der während der Inkubation an die Membran gebundenen Probe die Ergebnisse von Nakaya et al. (1970) bestätigen. Die durch den Elektronentransport induzierte 400%ige Extra-DABS-Bindung, die ohne weiteren Elektronenakzeptor im Inkubationsgemisch erhalten wird, wird durch DCMU völlig gehemmt. Die Anwesenheit des Entkopplers Nigericin während der Inkubation stimuliert die lichtinduzierte DABS-Bindung (Giaquinta et al. 1973, 1974a), d.h. die erhöhte Bindung ist nicht Folge eines Protonengradienten über die Thylakoidmembran. Umgekehrt führt weder PMS- noch Menadion- katalysierter zyklischer Elektronentransport (der einen pH-Gradienten aufbaut) zu einer erhöhten DABS-Bindung im Licht, sofern der offenkettige Elektronentransport durch DCMU gehemmt ist (Giaquinta et al. 1973, 1974b, c). Dagegen ist das Ausmaß der lichtinduzierten Bindung von DABS an die Membran proportional der vor (und natürlich auch während) der Inkubation möglichen Geschwindigkeit der Hill-Reaktion (Giaquinta et al. 1974a). DBMIB hemmt die Bindung teilweise.

Es ist offensichtlich, daß die von Dilley und Mitarbeitern untersuchten Eigenschaften der durch den Elektronentransport erhöhten Bindung von DABS an die Thylkoidmembran nicht nur mit der von diesen Autoren vorgeschlagenen Erklärung durch eine Konformationsänderung vereinbar sind. Die Resultate widersprechen nicht der Annahme, daß die erhöhte Bindung auf der Produktion einer reaktiven Species durch den Elektronentransport der Chloroplasten während der Inkubation im Licht beruhen kann.

2.4. Hemmung von Photosystem I durch ein Antiserum gegen eine strukturelle Komponente

2.4.1. Vergleich des Einflusses von Antiseren und chemischer Modifikation auf Photosystem I

Durch Immunisierung von Kaninchen mit unfragmentierten Thylakoidsystemen aus Antirrhinum konnten zwei Typen von Antiseren erhalten werden, die Photoreduktionen durch Photosystem I (auch in Spinat-Chloroplasten) spezifisch hemmen. Der eine Typ (repräsentiert durch das Antiserum 6C₁₄) hemmt ausschließlich Ferredoxin-abhängige Reaktionen wie NADP- und Cytochrom c-Reduktion, der andere Typ hemmt zusätzlich noch die Reduktion von Anthrachinonsulfonat, nicht aber von Methylviologen (Regitz 1970, Regitz et al. 1970). Jedoch sind auch Antiseren beschrieben worden, die die Methylviologen-Reduktion durch Photosystem I beeinträchtigen (Koenig et al. 1972, Menke et al. 1975). Gemeinsam ist der Modifikation der Thylakoidmembran durch imper-

meable Diazoniumsalze und durch Antiseren, daß beide Arten von molekularen Sonden nur mit Komponenten an der Oberfläche der Thylakoidvesikel reagieren können, falls die Membranen nicht aufgebrochen werden können. Trotz der unterschiedlichen Spezifität der Sonden führt die chemische Modifikation der Thylakoidmembran zu qualitativ gleichen Hemmungen wie die Antiseren.

Die chemische Modifikation der nichtenergetisierten Membran hemmt, wie Antiseren vom Typ $6C_{14}$, spezifisch die Ferredoxin-Reduktion durch Photosystem I. (Kapitel 2.2.2.a.). Eine Hemmung der Reduktion von Anthrachinonsulfonat (ohne Beeinträchtigung der Methylviologen-Reduktion) wird durch die chemische Modifikation nicht verursacht, jedoch kann sie (bei Inkubation im Licht) wie manche Antiseren die Reduktion von Methylviologen hemmen (Kapitel 2.2.2.b.).

Regitz (Regitz 1970, Regitz und Oettmeier 1971) konnte aus lyophilisierten Thylakoiden nach Extraktion mit Diäthyläther eine Fraktion gewinnen (genannt S_{L-eth}), die die Hemmung des Antiserums $6C_{14}$ in der Ferredoxin-Reduktion neutralisiert. Aus S_{L-eth} konnte eine Proteinfraction abgetrennt werden (genannt HM 275 wegen ihres Absorptionsmaximums bei 275 nm), die diese neutralisierenden Antigene enthält, also entweder Teile des Primärakzeptorkomplexes von Photosystem I enthält oder zumindest Komponenten, die dem Primärakzeptorkomplex so benachbart sind, daß ihre Modifikation einen Einfluß auf die Aktivität von Photosystem I hat.

2.4.2. Polyphenoloxidase-Aktivität von HM 275

Thylakoidsysteme von Spinat-Chloroplasten enthalten eine latente Polyphenoloxidase (Arnon 1949, Trebst 1962). Durch Untersuchung des Elektron-Spin-Resonanz-Spektrums der Antigenpräparation HM 275 konnte Oettmeier ein Cu-Signal feststellen (persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung führte zur Entdeckung der Polyphenoloxidase-Aktivität von HM 275. Diese enzymatische Aktivität ist in Abb. 19 dokumentiert, wobei die Oxidation von Dopamin spektralphotometrisch gemessen wurde.

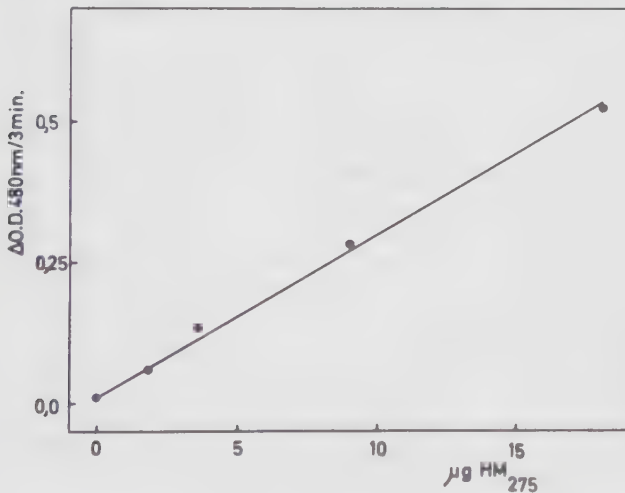


Abb. 19: Polyphenoloxidase-Aktivität von HM 275

Reaktionsbedingungen: 3 ml 0,02 M Na-K- Phosphat-Puffer (pH 7,0) enthielten 1 μMol Dopamin und die angegebenen Proteinmengen. Start der Reaktion durch Dopamin. Test bei Raumtemperatur unter Luft.

Nach Fraktionierungsstudien ist die Polyphenoloxidase-Aktivität von Chloroplasten mit Photosystem I-Partikeln assoziiert

(Parish 1972). Ihre Bedeutung für den Elektronentransport ist bis heute unklar. Neuerdings wird eine Beteiligung der Polyphenoloxidase an der Sauerstoffreduktion durch die Akzeptor-seite von Photosystem I diskutiert (Elstner, Selman und Stoffer in Vorbereitung). Wegen ihrer vermutlichen Lokalisation war es daher denkbar, die in der HM 275-Präparation enthaltene Polyphenoloxidase als das Antigen anzusehen, das die Hemmung der Ferredoxin-Reduktion durch das Antiserum 6C₁₄ bei Vorinkubation mit diesem Serum neutralisieren kann.

Es wurde deshalb ein Antiserum gegen gereinigte Polyphenoloxidase aus Spinat hergestellt. Dieses Antiserum hemmt die Polyphenoloxidase-Aktivität von HM 275 zu etwa 45% (Abb. 20).

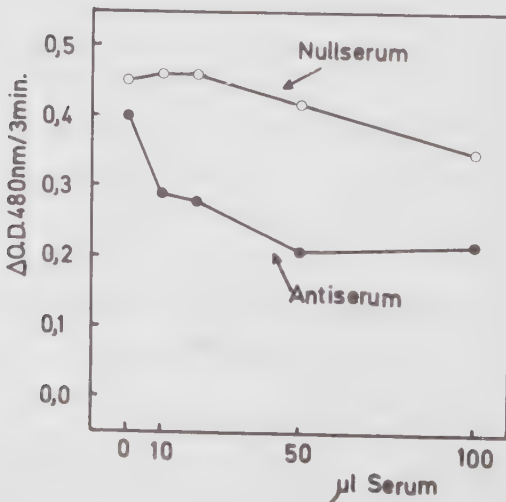


Abb. 20: Hemmung der Polyphenoloxidase-Aktivität von HM 275 durch ein Antiserum gegen Polyphenoloxidase aus Spinat

Reaktionsbedingungen: Je 18 μg HM 275 wurden mit den angegebenen Volumina Null- oder Antiserum in 0,3 ml 0,133 M Na-K-Phos-

phat-Puffer (pH 7,0) für 10 min vorinkubiert. Nach dem Verdünnen der Lösung auf 3 ml wurde die Polyphenoloxidase-Aktivität, wie zu Abb. 19 beschrieben, ohne Abzentrifugation des Antikörper-Antigen-Komplexes bestimmt.

Obwohl das Antiserum offenbar mit der Polyphenoloxidase in HM 275 reagiert, wird die photosynthetische NADP-Reduktion durch das Antiserum gegen die gereinigte Polyphenoloxidase nicht beeinflusst (Abb. 21, zum Vergleich ist die Hemmung dieser Reaktion durch das Antiserum 6C₁₄ eingetragen).

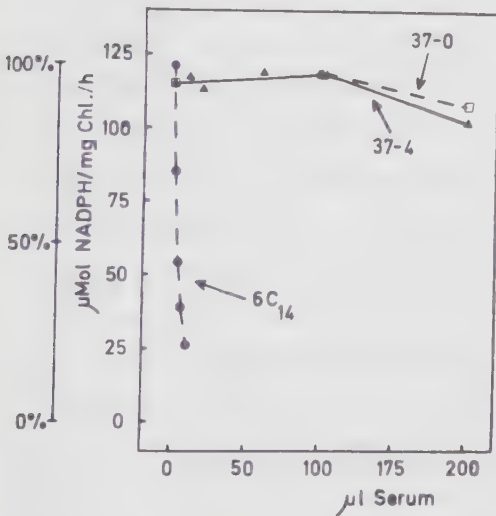


Abb. 21: Einfluß eines Polyphenoloxidase-Antiserums (37-4) und seines Nullserums (37-0) auf den Elektronentrans- von DAD/Ascorbat → NADP

Zum Vergleich ist in der Abbildung die Hemmung der Reaktion durch das Antiserum 6C₁₄ gezeigt.

Reaktionsbedingungen: Eine sättigende Reduktasemenge wurde in 0,4 ml 0,05 M Tris- HCl- Puffer (pH 8,0) + 12,5 mM NH₄ Cl mit den angegebenen Volumina Serum für 10 min bei 4°C vor-

inkubiert. Anschließend wurde mit einer Chloroplastensuspension (mit 10 μg Chl) auf 0,5 ml aufgefüllt und für weitere 15 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Dann wurde die NADP-Reduktion in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei Raumtemperatur gemessen, die Belichtungszeit betrug 5 min. (siehe Material und Methoden).

Umgekehrt ist es nicht möglich, mit dem Antiserum 6C₁₄, das die NADP-Reduktion hemmt, die Polyphenoloxidase-Aktivität von

HM 275 zu hemmen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Einfluß des Antiserums $6C_{14}$ auf die Polyphenoloxi-
dase-Aktivität von HM 275

μl $6C_{14}$	0	2	4	10	30
O.D. _{480nm} /3. min	0,540	0,520	0,510	0,520	0,500

Reaktionsbedingungen: siehe Legende zu Abb. 20. Es wurde jedoch kein Nullserum verwendet.

Diese Ergebnisse sind bereits ein Hinweis darauf, daß die Polyphenoloxidase-Aktivität von HM 275 und seine Aktivität als neutralisierendes Antigen des Antiserums $6C_{14}$ nicht auf demselben Protein lokalisiert sind. Die fehlenden Wechselbeziehungen von Polyphenoloxidase, neutralisierendem Antigen, Antiserum $6C_{14}$ und Polyphenoloxidase-Antiserum lassen sich aber andererseits immer noch so erklären, daß das Antigen beider Antiseren ein und dasselbe Protein ist. Man muß dann annehmen, daß das Antiserum $6C_{14}$ trotz Reaktion mit der Polyphenoloxidase deren Aktivität nicht hemmt, das Polyphenoloxidase-Antiserum seinerseits für die NADP-Reduktion nicht hemmend ist. Beispiele für zwar reagierende, aber nicht hemmende oder sogar die Funktion ihrer Antigene stimulierende Antiseren sind bekannt (vergl. Cinader 1963, Melchers und Messer 1973). Zur Unterscheidung zwischen beiden Alternativen wurde HM 275 weiter gereinigt mit dem Ziel, die Polyphenoloxidase-Aktivität abzutrennen.

2.4.3. Abtrennung der Polyphenoloxidase-Aktivität der HM 275- Präparation von der Antigen-Aktivität

Die von Regitz und Oettmeier (1971) beschriebene Reinigung von HM 275 aus S_{L-eth} ergibt Fraktionen, deren spezifische Polyphenoloxidase-Aktivität in dem verwendeten Testsystem 5 $\cdot 10^4$ O.D._{480nm}/mg Protein/min beträgt (siehe Abb. 19 und diesen Abschnitt). Zur weiteren Reinigung der durch Säulenchromatographien isolierten Fraktion wurde nach fraktionierter $(NH_4)_2SO_4$ -Fällung (30-50% Sättigung) das Protein an einer mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,2) vorbehandelten DE-52-Säule adsorbiert und mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,0 - 0,3 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,2), insgesamt 500 ml) eluiert.

Auf diese Weise konnte die Hauptmenge des Proteins von den Fraktionen mit der größten Polyphenoloxidase-Aktivität abgetrennt werden (Abb. 22). Die Fraktionen des Protein"peak"

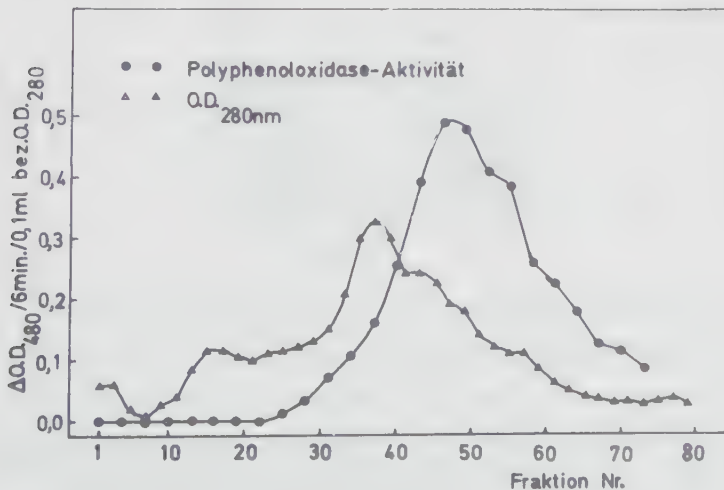


Abb. 22: Chromatographie von HM 275 an DE-52

Legende zu Abb. 22: Elution mit einem linearen Gradienten von 0,0-0,3 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl (pH 7,2), Gesamtvolumen 500 ml. Größe der Säule: 2 x 10 cm. Fraktionen von 6 ml wurden gesammelt und ihr Proteingehalt (O.D. bei 280 nm) und ihre Polyphenoloxidase-Aktivität (Testbedingungen in der Legende zu Abb. 19) bestimmt. Chromatographie bei 4°C, Fließgeschwindigkeit des Gradienten 80 ml/h.

(im gezeigten Säulenlauf die Fraktionen 25-40) wurden vereinigt und erneut durch eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung fraktioniert (30-50% Sättigung). Das Protein konnte in 0,02 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) bei -20°C aufbewahrt werden.

Abb. 23 vergleicht die Neutralisation der Hemmung der NADP-Reduktion durch das Antiserum 6C₁₄ mit einer HM 275-Präparation

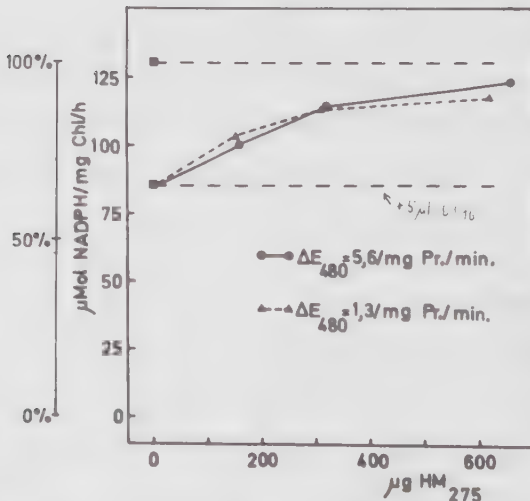


Abb. 23: Aufhebung der Hemmung der NADP-Reduktion durch das Antiserum 6C₁₆ durch Neutralisation mit HM 275-Präparationen verschiedener Polyphenoloxidase-Aktivität

Testbedingungen: Das Antiserum wurde mit den angegebenen Mengen HM 275 und einer sättigenden Reduktasemenge in 0,4 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) + 12,5 mM NH_4Cl für 10 min bei 4°C vorinkubiert. Dann wurden, wie in der Legende zu Abb. 21 be-

schrrieben, die Chloroplasten zugegeben und nach 15 min die NADP-Reduktion gemessen.

ΔE_{480} gibt die spezifischen Polyphenoloxidase-Aktivitäten der HM 275-Präparationen an.

vor (spezifische Polyphenoloxidase-Aktivität = $5,640 \cdot D_{480nm} / \text{mg Protein/min}$) und nach der Chromatographie an der DE-52-Säule (spezifische Aktivität = $1,340 \cdot D_{480nm} / \text{mg Protein/min}$). Obwohl die spezifische Polyphenoloxidase-Aktivität der Präparation durch die zusätzliche Reinigung auf weniger als $1/4$ der ursprünglichen Aktivität zurückgegangen ist, ist die Aktivität als neutralisierendes Antigen auf Proteinbasis etwa gleichgeblieben. Die Aktivität als neutralisierendes Antigen ist somit unabhängig von der Polyphenoloxidase-Aktivität.

Einen weiteren Beweis dafür, daß die beiden ^{Aktivitäten} der HM 275-Präparation auf verschiedenen Proteinen lokalisiert sind, erbringt die Immundiffusion (Abb. 24).

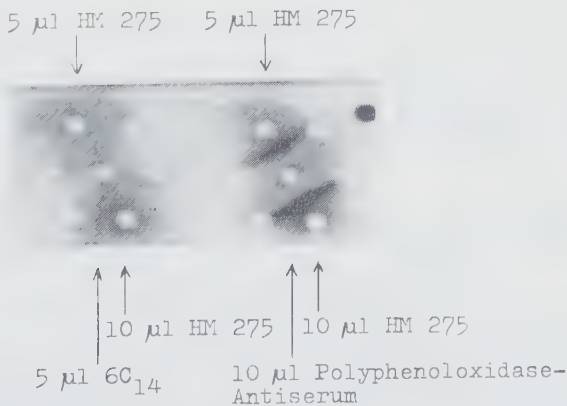


Abb. 24: Immundiffusion von rohem HM 275 gegen Antiserum $6C_{14}$ und ein Polyphenoloxidase-Antiserum. Anfärbung mit Dopamin. Erläuterungen im Text.

Eine (wenig gereinigte) HM 275-Präparation ergibt gegen das Antiserum 6C₁₄ eine Präzipitationslinie, gegen^e das Polyphenoloxidase-Antiserum (37-4) werden zwei Präzipitationslinien sichtbar. Nach dem Auswaschen des nichtpräzipitierten Proteins aus dem Gel wurden diese nicht, wie üblich, einer Proteinfärbung unterworfen, sondern mit einer Lösung von Dopamin, einem Substrat der Polyphenoloxidase, angefärbt und anschließend photographiert (Abb. 24). Obwohl das Antiserum 6C₁₄ die Polyphenoloxidase-Aktivität von HM 275 nicht hemmt (vergl. Tabelle 8), läßt sich seine Präzipitationslinie mit der HM 275-Präparation nicht anfärben. Beide Präzipitationslinien des Polyphenoloxidase-Antiserums mit der HM 275-Präparation werden dagegen infolge der Oxidation von Dopamin intensiv rotbraun gefärbt.

Das Antiserum 6C₁₄ enthält demnach weder präzipitierende noch hemmende Antikörper gegen die in den HM 275-Präparationen enthaltene Polyphenoloxidase. Das Antiserum 6C₁₄ präzipitiert ein Protein der HM 275-Präparation, vermutlich das neutralisierende Antigen. Dieses Antigen zeigt keinerlei Polyphenoloxidase-Aktivität. Die Polyphenoloxidase ist daher als Verunreinigung des neutralisierenden Antigens von 6C₁₄ aufzufassen.

2.4.4. Funktion des Antigens in der Membran

Nach der Abtrennung der Polyphenoloxidase-Aktivität hat die Antigenfraktion keinerlei fassbare katalytische Aktivität mehr. In der SDS-Gelelektrophorese zeigen sich mehrere Banden (Abb. 25). Das Polypeptid mit der höchsten Konzentration korrespondiert mit einem Molekulargewicht von 55 000 - 57 000. (Die Be-

stimmung des Molekulargewichtes wurde in Kooperation mit Dr. Nelson, Haifa, durchgeführt). Wegen geringer Ausbeuten (4 - 8 mg Protein aus Chloroplasten mit 1 g Chl) wurde von einer weiteren Reinigung abgesehen.

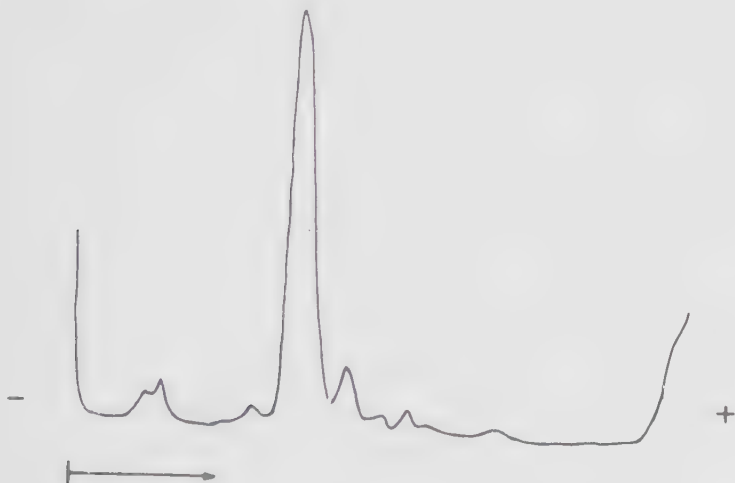


Abb. 25: Densitogramm der SDS-Gelelektrophorese von HM 275

Das Gel wurde nach Färbung mit Coomassie Brilliantblau bei einer Wellenlänge von 600 nm gescant. Elektrophorese nach der Methode von Weber und Osborn (1969).

Polypeptide dieses Molekulargewichtes (50 000 - 70 000) sind in Fraktionen aus Thylkoiden angereichert, deren Photosystem I-Gehalt hoch ist (Anderson 1975, Klein und Vernon 1974, Levine et al. 1972). Die am weitesten gereinigte Photosystem I-Präparation, aus Thylakoidsystemen von Mangold, enthält ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 70 000 (Bengis und Nelson 1975). Es wird von den Autoren als das Polypeptid des Reaktionszentrums P₇₀₀ angesehen. Antiseren gegen dieses Polypeptid

hemmen die NADP-Reduktion in Salat-Chloroplasten und agglutinieren sie. Die Methylviologen-Reduktion durch Photosystem I wird durch die Antiseren nicht beeinflusst (Bengis und Nelson 1975). Was ihren Einfluß auf Photoreduktionen durch Photosystem I betrifft, gleichen diese Antiseren dem Antiserum 6C₁₄. Ein Antiserum gegen die Photosystem I-Präparation aus Mangold wurde von Herrn Dr. N. Nelson freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

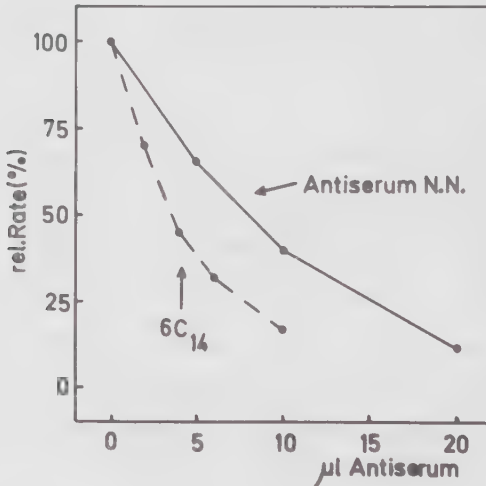


Abb. 26: Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ NADP in Spinat-Chloroplasten durch ein Antiserum gegen eine Photosystem I-Präparation aus Mangold

Das Antiserum ist in der Tabelle als "N. N." bezeichnet. Die Werte für die Hemmung der Reaktion durch das Antiserum 6C₁₄ sind der Abb. 21 entnommen. Testbedingungen: Wie in der Legende zu Abb. 21 angegeben. Kontrollraten: 120 - 130 μ Mol NADPH/mg Chl/h.

Wie Abb. 26 zeigt, hemmt dieses Antiserum (gerichtet gegen

das Polypeptid mit dem Molekulargewicht von 70 000) auch die NADP-Reduktion durch Chloroplasten aus Spinat. Sein Hemmtiter ist etwa halb so groß wie der des Antiserums 6C₁₄. Erneut zeigt sich damit, daß die Thylakoidsysteme höherer Pflanzen immunologisch kreuzreagierende Komponenten enthalten (Antiserum 6C₁₄ war durch Immunisierung mit Antirrhinum-Thylakoiden erhalten worden und hemmt Reaktionen in Spinat-Chloroplasten).

Es war jedoch nicht möglich, im Ringtest oder in der Immundiffusion eine Präzipitationsreaktion des Antiserums gegen das Photosystem I-Reaktionszentrum von Mangold mit rohem oder angereichertem HM 275 zu erhalten, obwohl das Antiserum sein homologes Antigen präzipitiert (Bengis und Nelson 1975). Es ist deshalb, und wegen der unterschiedlichen Molekulargewichte, anzunehmen, daß das in HM 275 angereicherte neutralisierende Antigen von Antiserum 6C₁₄ mit dem Polypeptid des Photosystem I-Reaktionszentrums nicht identisch ist.

Obwohl das Antiserum gegen HM 275 die Reduktion von Ferredoxin durch Photosystem I hemmt, kann HM 275 weder eine Funktion als katalytisch aktiver Komponente auf der Akzeptorseite von Photosystem I zugesprochen werden noch ist anzunehmen, daß es Teil des Reaktionszentrums P₇₀₀ ist. Die wahrscheinlichste Annahme ist, daß es strukturell an der Akzeptorseite von Photosystem I lokalisiert ist, entweder als Apoenzym eines Elektronencarriers oder als Membranbestandteil, der für die katalytischen Aktivitäten dieses Bereiches nicht unmittelbar notwendig ist. Letztere Annahme bedeutet, daß die Hemmung der Ferredoxin-Reduktion durch das Antiserum 6C₁₄ wahrscheinlich auf einer sterischen Hemmung durch das relativ große Antikörpermolekül beruht.

2.4.5. Antiseren gegen gereinigtes HM 275

Gereinigtes HM 275 wurde zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet. Beide Kaninchen bildeten präzipitierende Antikörper. Beide Antiseren waren jedoch nach wiederholter Immunisierung nicht monospezifisch, sondern zeigten in der Immunelektrophorese auch gegenüber dem zur Immunisierung verwendeten Präparat zwei (eine starke und eine schwache) Präzipitationsbande.

Die Antiseren hemmen die Reaktion $\text{DAD/Ascorbat} \rightarrow \text{NADP}$. Die maximal gemessene Hemmung betrug etwa 30% (Tabelle 9). Die Hemmung ist damit erheblich geringer als die annähernd vollständige Hemmung dieser Reaktion mit dem komplexen Antiserum 6C₁₄.

Tabelle 9: Einfluß von Antiseren gegen gereinigtes HM 275 auf die Reaktion $\text{DAD/Ascorbat} \rightarrow \text{NADP}$

Antiserum	μl	$\mu\text{Mol NADPH/mg Chl/h}$	Hemmung in %
"78-7"	---	105	--
	20	85	19
	50	82	22
	100	76	28
"79-7"	---	105	--
	20	84	20
	50	80	24
	100	75	28

Testbedingungen: Wie in der Legende zu Abb. 21 beschrieben, wurden die Antiseren zuerst mit einer sättigenden Reduktasemenge, dann mit den Chloroplasten vorinkubiert und anschließend die NADP-Reduktion gemessen. Die Seren wurden mit ihren Nullseren (78-0 und 79-0) verdünnt, sodaß jede Küvette das gleiche Volumen Serum enthielt.

Die Antiseren gegen HM 275 agglutinieren Thylakoidsysteme. Da die Möglichkeit besteht, daß auch die Agglutination von Thylakoidsystemen zu der Hemmung der Ferredoxin-Reduktion beiträgt, wurde getestet, ob Antiseren, die nicht gegen eine Komponente des Elektronentransportsystems gerichtet sind, einen Einfluß auf diese Reaktion haben. Benutzt wurde dazu ein Antiserum gegen den Coupling Factor I der Chloroplasten (Tabelle 10).

Tabelle 10: Hemmung der Reaktion DAD/Ascorbat $\rightarrow$ NADP durch ein Antiserum gegen CF₁

CF ₁ -Antiserum μ l	μ Mol NADPH/mg Chl/h	Hemmung in %
0	159	--
10	145	9
20	141	11
40	135	15
100	125	22

Testbedingungen: Wie in der Legende zu Abb. 21 angegeben. Jede Küvette enthielt durch Zugabe von Nullserum dasselbe Volumen Serum. Antiserum und Nullserum waren mit H₂O 1:2 verdünnt. Als Entkoppler enthielt das Reaktionsgemisch 5 mM NH₄Cl.

Gefunden wurde eine maximale Hemmung von etwa 20%. Da eine Hemmung über die photosynthetische Kontrolle ausgeschlossen war, weil unter entkoppelten Bedingungen getestet wurde, kann man diese Hemmung der Agglutination der Thylakoide durch das Antiserum zusprechen. Wegen dieses Befundes muß als unklar angesehen werden, ob die Hemmung der NADP-Reduktion durch die Antiseren gegen gereinigtes HM 275 durch eine Reaktion der Antikörper an der Akzeptorseite von Photosystem I hervor-

rufen wird oder durch die Agglutination der Partikel verursacht wird.

2.4.6. Reaktion von HM_275 in situ mit ^{35}S -DABS

Das Antiserum 6C₁₄ und die chemische Modifikation der Oberfläche der Thylakoidmembran durch Diazoniumsalze (bei Inkubation im Dunkeln) beeinträchtigen Photoreduktionen durch Photosystem I in der gleichen Weise: Die Reduktion von Ferredoxin ist gehemmt, Methylviologen- und Anthrachinonsulfonat-Reduktion bleiben unbeeinflusst. Das Antiserum 6C₁₄ ist wahrscheinlich gegen eine katalytisch inaktive Membrankomponente gerichtet; das gleiche könnte für die Diazoniumsalze gelten. Mithilfe des Antiserums ist es möglich, selektiv nachzuweisen, ob sein Antigen einer der Reaktionsorte der chemischen Proben an der Membranoberfläche ist.

Dazu wurden Chloroplasten im Dunkeln mit ^{35}S -DABS inkubiert und nach dem Auswaschen des überschüssigen Reagenzes aus diesen Chloroplasten der S_{L-eth}-Extrakt hergestellt (vergl. Regitz und Oettmeier 1971). Durch Chromatographie an Sephadex G-75 wurden die das Antigen enthaltenden Fraktionen von den niedermolekularen Komponenten abgetrennt. Diese Fraktionen waren im Gegensatz zu Aufarbeitungen nicht modifizierter Thylakoidsysteme leicht trüb. Nach der Konzentrierung der Fraktionen durch Ultrafiltration (Ultrafilter UM 0,5, siehe Material und Methoden) wurden sie ohne weitere Reinigung in der Immundiffusion gegen das Antiserum 6C₁₄ getestet. Nach der Diffusion wurde das Gel mit Amidoschwarz auf Protein angefärbt und anschließend eine Autoradiographie durchgeführt (Expositionszeit 4 Woch-

en).

Wie Abb. 27 zeigt, bildet sich bei der Antikörper-Antigen-Reaktion eine Präzipitationslinie, die in die Präzipitationslinie des Antiserums mit gereinigtem nichtmodifiziertem HM 275 hineinläuft ("line of identity", vergl. Ouchterlony 1968). Der Teil der Präzipitationslinie, der durch Reaktion des Antiserums mit modifiziertem Protein gebildet wird, enthält Radioaktivität. Durch die "line of identity" ist dieses modifizierte Protein als HM 275 (oder kreuzreagierend) identifiziert.

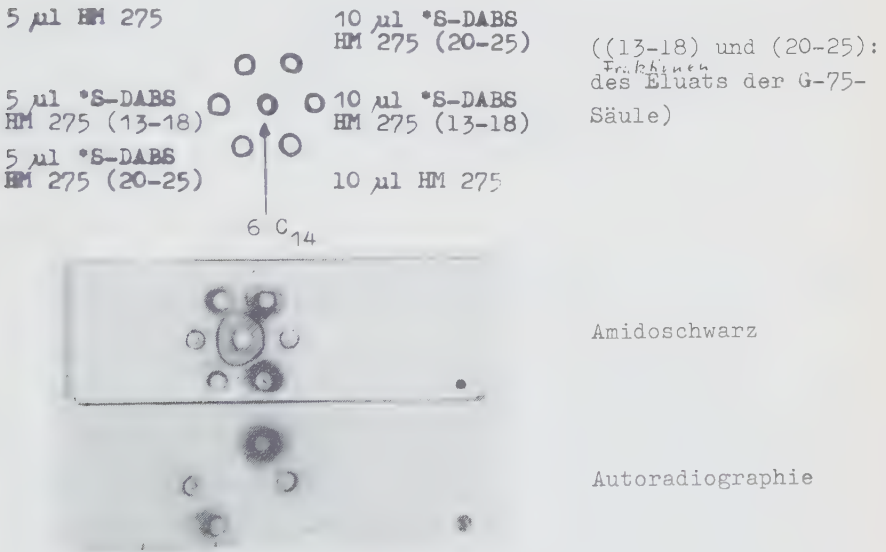


Abb. 27: Immundiffusion des mit ^{35}S -DABS in situ modifizierten HM 275.

HM 275 ist also in der Membran der chemischen Modifikation mit DABS ausgesetzt. Das qualitative Resultat läßt keine Aussage darüber zu, ob die Reaktion dieses Proteins mit der Probe

besonders ausgeprägt ist, d.h. ob es in besonderem Maße der die Thylakoidvesikel umgebenden wässrigen Phase exponiert ist und ob seine Modifikation seine Modifikation die Hemmung der Ferredoxin-Reduktion durch die Modifier verursacht.

Bemerkenswert ist, daß das mit DABS in situ modifizierte HM 275 durch das Antiserum noch präzipitiert wird und auch keinerlei Spornbildung in der Immundiffusion auftrat. Hier nicht gezeigte Versuche ergaben, daß der Elektronentransport von im Dunkeln modifizierten Thylakoidsystemen durch das Antiserum $6C_{14}$ relativ in etwa demselben Maße gehemmt wird wie bei nichtmodifizierten Kontrollchloroplasten. Dies deutet darauf hin, daß die Modifikation von HM 275 in situ mit Diazoniumsalzen nur wenige oder keine Determinanten auf dem Protein so verändert, daß eine Reaktion mit dem Antiserum unmöglich wird.

2.4.7. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.4.

Die Fraktion HM 275, die durch das komplexe Antiserum $6C_{14}$ verursachte Hemmung der Ferredoxin-Reduktion neutralisiert, hat nach der Abtrennung der Polyphenoloxidase-Aktivität keine fassbare katalytische Aktivität mehr. Ein Rekonstitutionsexperiment, das zeigen könnte, ob es sich bei HM 275 um den Primärakzeptor oder um einen Bestandteil des Primärakzeptors von Photosystem I handelt, erfordert Chloroplastenpräparationen, denen diese Komponente fehlt. Eine Präparation dieser Art (von Yocum und San Pietro (1969, 1970)) führte zum Postulat einer "Ferredoxin-Reduzierenden Substanz" (FRS). Die Präparation scheint, wenn überhaupt, nur schwer reproduzier-

bar zu sein. Die Informationen über die Funktion des Antigens sind deshalb indirekt, da ein spezifisches Testsystem für den Primärakzeptor von Photosystem I fehlt.

Das komplexe Antiserum 6C₁₄ enthält wahrscheinlich Antikörper gegen mehrere Membranbestandteile. Außer HM 275 sind davon zwei bekannt (Regitz 1970): Der Kopplungsfaktor der Photophosphorylierung und die Ferredoxin-NADP-Reduktase. Da diese Antikörper Thylakoide agglutinieren oder adsorbiert werden würden, ist es direkt nicht möglich, eine Reaktion des Antiserums mit HM 275 in situ zu beweisen. Die Zugänglichkeit des Antigens für seinen Antikörper im Membranverband wird aus dem Befund geschlossen, daß das isolierte Antigen die Hemmung der Ferredoxin-Reduktion neutralisiert, HM 275 in situ mit der nichtpermeablen Probe DABS reagiert und daß Antiserum gegen das isolierte Antigen Chloroplasten agglutinieren.

10 µg HM-275-Protein geben in der Immundiffusion mit 5 µl Antiserum 6C₁₄ eine scharfe Präzipitationslinie. (Abb. 27). In Neutralisationsexperimenten (Abb. 23) werden dagegen 400-600 µg Protein benötigt, um die Hemmwirkung von 5 µl Antiserum zu neutralisieren. Dieser große Unterschied zwischen Präzipitations- und Neutralisationstitern der Antigenpräparation kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits ist denkbar, daß das Polypeptid der Präparation, das in der größten Konzentration vorhanden ist, neutralisierendes und präzipitierendes Antigen ist, während der Isolierung aus der Membran seine Affinität zu seinem homologen Antikörper aber geringer geworden ist. Da in einem Neutralisationsexperiment der Art, wie sie in der Arbeit durchgeführt wurden, die Bindung des hemmenden Antikörpers an das isolierte Antigen mit der Bindung an die Kom-

ponente in situ in Konkurrenz steht, muß die geringere Affinität durch eine größere Konzentration des isolierten Antigens ausgeglichen werden. Andererseits könnte das Antigen mehr Determinanten auf demselben Molekül besitzen, die zu einer Präzipitation führen, als solche, die zu einer Aufhebung der Hemmung führen, und aus diesem Grund die Äquivalenz in der Präzipitation anders als in der Neutralisation sein. Die dritte Möglichkeit ist, daß das als Antigen isolierte Polypeptid zwar mit einer Antikörperpopulation des Antiserums reagiert, aber nicht das neutralisierende Antigen ist. Falls die ersten beiden Möglichkeiten nicht zutreffen, könnten Verunreinigungen des isolierten Antigens in der Größenordnung von wenigen Prozent das neutralisierende Antigen sein.

Die plausible Annahme, daß das Antigen bei der Herauslösung aus dem Membranverband seine native Struktur teilweise verloren hat, kann erklären, warum Antiserum gegen das gereinigte HM 275 die Ferredoxin-Reduktion nur teilweise (30%) hemmen. (Antiserum sind in der Regel nicht gegen die Primärstruktur von Proteinen, sondern gegen deren Konformation gerichtet (Cinader 1963)).

Der negative Ausgang von Funktionstests für aus einer Membran isolierte Komponenten hat prinzipiell wenig Aussagewert. Daß für HM 275 keine katalytische Funktion in der Ferredoxin-Reduktion gefunden werden kann, bedeutet keineswegs, daß es eine solche Funktion nicht hat. Die Hypothese mit den wenigsten Voraussetzungen ist allerdings die, anzunehmen, daß dieses Protein eine strukturelle Funktion in der Membranoberfläche der Thylakoide im Bereich der Akzeptorseite von Photosystem I hat.

3. Diskussion

Das ursprüngliche Konzept für eine Untersuchung der räumlichen Anordnung membrangebundener Prozesse ging von einem statischen Membranmodell aus. Die Verwendung von Antikörpern für derartige Lokalisationen bot sich wegen der Impermeabilität und hohen Spezifität dieser Reagentien an. Die Methode wurde und wird für die Untersuchung der "sidedness" der Thylakoidmembran der Chloroplasten mit Erfolg angewandt (vergl. die Uebersicht von Berzborn und Lockau (im Druck)). Das Interpretationschema für die Ergebnisse dieser Methode ist im wesentlichen folgendes: Reagiert der Antikörper mit seinem Antigen direkt, so ist dieses Antigen an der Außenseite der Membran lokalisiert; führt die Reaktion zur Hemmung einer Reaktion des membrangebundenen Enzymsystems, so ist das Antigen ein katalytisch aktiver Teil dieses Enzymsystems.

Es ist nicht anzunehmen, daß ein solches Schema alle Effekte von Modifikationen von funktionellen Membranen erklären kann, für deren Struktur heute ein mehr dynamisches Konzept besteht (z.B. Singer und Nicolson 1972). Gerade bei der Untersuchung des photosynthetischen Elektronentransportes mit Antikörpern häufen sich Befunde, deren Einordnung in das oben angedeutete starre Interpretationsschema schwerfällt. So müßte bei der Interpretation bestimmter Ergebnisse, etwa der Hemmung der Wasserspaltung durch Antiseren, den jeweiligen Antigenen eine Funktion zugesprochen werden, die sie wahrscheinlich nicht haben.

Ein besonders gutes Beispiel für diese aktuelle Frage der

Beziehung von Struktur und Funktion ist die Charakterisierung des Primärakzeptorkomplexes von Photosystem I. Dieser der Matrixseite der Thylakoidmembran zugewandte Komplex besteht neben P_{700} aus Redox-Carriern, die zur Uebertragung der Reduktionsäquivalente auf das lösliche Ferredoxin erforderlich sind. Wegen seiner Zugänglichkeit kann die Struktur des Komplexes mit Hilfe von impermeablen Proben (Antiseren und chemischen Sonden) bearbeitet werden. Beide Methoden wurden in der Arbeit angewendet und miteinander verglichen.

Das Antiserum 6C₁₄ hemmt spezifisch die Ferredoxin-Reduktion durch Photosystem I. Sein neutralisierendes Antigen, das in dieser Arbeit charakterisiert wurde, ist in einer zunächst von Regitz (1970) isolierten rohen Antigen-Fraktion (S_{L-eth}) vorhanden. Diese Fraktion enthält einen oder mehrere Elektronencarrier, die von Photosystem I reduziert werden können und ihrerseits einen zugegebenen Elektronenakzeptor, oxidiertes Cytochrom c, reduzieren können. Wegen der geringen Spezifität der Akzeptorseite von Photosystem I und des positiven Redoxpotentials von Cytochrom c ist der Aussagewert dieses Testsystems für die ursprüngliche Funktion der isolierten Komponenten jedoch als gering anzusehen (Oettmeier und Lockau 1973). Es war möglich, die in der Cytochrom c-Reduktion katalytisch aktiven Komponenten der Antigenfraktion abzutrennen, ohne die Funktion der Fraktion als neutralisierendes Antigen zu beeinträchtigen (Regitz und Oettmeier 1972). Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, kann noch eine weitere Komponente der Fraktion mit einer katalytischen Aktivität, eine Polyphenoloxidase, abgetrennt werden. Das die Hemmung der Photoreduktion von Ferredoxin durch das Antiserum neutralisierende Antigen ist nach der

Abtrennung der Polyphenoloxidase in einer Fraktion enthalten, die hauptsächlich aus einem Protein mit einem Molekulargewicht von 55 000 - 57 000 besteht und keine fassbare katalytische Aktivität hat.

Der Primärakzeptorkomplex von Photosystem I besteht neben P_{700} wahrscheinlich, wie aus Untersuchungen mit Hilfe von Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie hervorgeht, aus zwei oder drei Eisen-Schwefel-Proteinen mit Redoxpotentialen von - 500 bis - 600 mV (bei pH 7) (Evans et al. 1974, Ke et al. 1973). Weder das Molekulargewicht des isolierten Antigens noch sein Absorptions- und ESR-Spektrum geben aber einen Hinweis dafür, daß es sich um ein Eisen-Schwefel-Protein handelt. Daher ist die wahrscheinlichste Annahme, daß das neutralisierende Antigen in situ nicht als Elektronencarrier auf der Akzeptorseite von Photosystem I arbeitet. Da das isolierte Antigen auch mit einem Antiserum gegen das Reaktionszentrum von Photosystem I nicht reagiert, muß man ihm eine strukturelle Funktion an der Membranoberfläche im Bereich von Photosystem I zusprechen.

Falls diese Interpretation der Ergebnisse zutrifft, ist die Hemmung der Photoreduktion von Ferredoxin durch das Antiserum $6C_{14}$ ein Beispiel für die Hemmung einer membrangebundenen Reaktion ohne Reaktion der Probe mit einer katalytisch aktiven Komponente. Die Hemmung muß dann auf dem strukturellen Einfluß der Probe auf die Reaktion beruhen, der Ort der Reaktion der Probe muß nicht Ort der Hemmung sein. Aufgrund der Größe von Antikörpern (Molekulargewicht = 150 000 für einen IgG-Antikörper) liegt es nahe, für den speziellen Fall der Hemmung der Ferredoxin-Reduktion eine Behinderung des Zutritts von

Ferredoxin an seine Reduktionsstelle durch das gebundene Antikörpermolekül selber als Ursache für die Hemmung anzusehen. Das Fehlen der Hemmung der Reduktion von Elektronenakzeptoren wie Methylviologen wäre dann mit der geringen Größe dieser Elektronenakzeptoren zu erklären.

Eine solche sterische Hemmung von Enzymreaktionen durch Antiseren scheint der Regelfall bei gelösten Enzymen zu sein (Cinader 1963, Arnon 1971). Dabei reagiert das Antiserum mit dem katalytisch aktiven Molekül, wenn auch nicht mit dem katalytischen Zentrum. Bei membrangebundenen Prozessen muß diese Bindungsstelle der Probe offenbar nicht auf dem katalytisch aktiven Molekül lokalisiert sein, sondern kann auf einem benachbarten Molekül der Membran liegen.

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit ist, daß nicht die Größe der Probe die Hemmung der Reaktion einer benachbarten Komponente verursacht, sondern die Bindung der Probe an die Membran. Wiederum sind analoge intramolekulare Effekte bekannt. So kann die Reaktion von Antiseren mit Enzymen diese in eine inaktive Konformation bringen oder ein Enzym aus einer inaktiven in eine aktive Konformation überführen (z.B. Pollock 1964, Melchers und Messer 1973). In gleicher Weise ist denkbar, daß die Bindung einer Sonde an eine Membrankomponente die Struktur einer benachbarten Komponente in einer für eine Reaktion ungünstigen Weise verändert. Für den Fall des Antiserums $6C_{14}$ bedeutet dies, daß an der Reduktion von Elektronenakzeptoren wie Methylviologen diese Komponente nicht beteiligt ist.

Zur Klärung wurden Antikörper mit chemischen Sonden verglichen, bei denen aufgrund ihrer Kleinheit eine sterische Hemmung unwahrscheinlich ist. Wie das Antiserum hemmt die Mo-

difikation der Membranoberfläche durch Diazoniumsalze (im Dunkeln) die Reduktion von Ferredoxin durch Photosystem I, nicht aber die Reduktion von Methylviologen. Die bevorzugte Hemmung der Ferredoxin-Reduktion wird auch durch Modifikation der Membran mit anderen Sonden gefunden, so bei Lactoperoxidase-katalysierter Iodierung und Trypsin-Behandlung (Arntzen et al. 1974, Selman und Bannister 1974). Es erhebt sich die Frage, ob an der Reduktion von Ferredoxin mehr Elektronencarrier beteiligt sind als an der Reduktion von Methylviologen und sie der Modifikation stark ausgesetzt sind, oder ob die Reduktion von Ferredoxin stärker von Veränderungen der Membranstruktur beeinflusst wird als die Reduktion von Methylviologen.

Die unterschiedliche Hemmung der Ferredoxin-Reduktion durch die beiden verschieden geladenen Diazoniumsalze DABS und PTBDF deutet an, daß die gebundenen Modifizier je nach ihrer Ladung die optimale Konformation einzelner Komponenten oder auch des gesamten Reaktionsortes wegen des elektrostatischen Einflusses verschieden beeinträchtigen können.

Aus den Daten von Kok und Hoch (1961, P_{700} -Gehalt in Anacystis 1/400 des Chlorophyll a-Gehaltes) und Holton und Myers (1963, Ferredoxin-Gehalt 1/200 des Chlorophyll a-Gehaltes in Anacystis) läßt sich für diese Alge eine Relation von 2 Ferredoxin/ 1 P_{700} berechnen (Es sind jedoch auch höhere Ferredoxin-Gehalte bestimmt worden, z.B. Matson und Kimura 1975). Diese Relation legt nahe anzunehmen, daß das Ferredoxin an seinem Reaktionsort an der Membran adsorbiert wird und nicht unspezifisch. Die Adsorption von Ferredoxin an die Oberfläche der Thylakoidmembran wird verhindert, wenn die gebundene Reduktase

mit einem spezifischen Antiserum reagiert hat (Hiedemann-Van Wyk und Kannangara 1971). Unterstützt von der Annahme von Smeetsman und Krogmann (1975), daß die Reduktase an einen Membranbereich mit positiver Ladung gebunden sei, kann vermutet werden, daß die Reduktionsstelle von Ferredoxin an der Membran von vorwiegend positiven Ladungen umgeben ist und daher durch DABS in ihrer Funktion stärker als durch PTBDF beeinflusst wird. Diese Spekulation kann weiter erklären, warum die Modifikation der Thylakoidmembran mit Polykationen den Elektronentransport an der Akzeptorseite von Photosystem I nicht hemmt (Brand et al. 1971, 1972a, b), obwohl die Akzeptorseite für impermeable Sonden zugänglich ist. Denn die Bindung eines Polykations an einen positiv geladenen Membranbereich ist nicht zu erwarten.

Die Hemmung der Methylviologen Reduktion durch Photosystem I mit den Diazoniumsalzen bei Inkubation im Licht ist der erste klare Befund überhaupt, daß diese Reaktion durch impermeable Sonden gehemmt werden kann. Zwar werden bei dieser Behandlung die Diazoniumsalze durch den Elektronentransport der Chloroplasten reduziert und die Hemmung wahrscheinlich durch die Veränderung der Reaktivität der Sonden verursacht, es ist aber nicht anzunehmen, daß durch den Verlust der Diazoniumgruppe die Permeabilität der entstehenden reaktiven Substanzen erhöht wird. Bei der Reduktion verlieren die Diazoniumsalze nicht die Substituenten des Benzolringes. Die Sulfanilsäure, eine dem Reduktionsprodukt von DABS ähnliche Verbindung, kann die Thylakoidmembran nicht permeieren (Selman et al. 1974b). Da dieselbe Hemmung mit Diazoniumsalzen mit negativ geladenem Substituenten (DABS) und mit positiv geladenem Substitu-

enten (PTBDF) gefunden wird, ist ausgeschlossen, daß sie durch eine Elektrophorese der Proben in dem bei Belichtung aufgebauten elektrischen Feld über die Chloroplastenmembran zu erklären ist. Jedenfalls sind auch an der Reduktion von Methylviologen durch Photosystem I beteiligte Elektronencarrier oder Membranbereiche, vielleicht das Reaktionszentrum von Photosystem I selber, für hydrophile Sonden zugänglich.

In letzter Zeit mehren sich Befunde, die für spezifische Konformationsänderungen der Chloroplastenmembran im Licht sprechen. Außer dem Kopplungsfaktor (Ryrie und Jagendorf 1971, McCarty et al. 1972) scheint das Wasserspaltungssystem seine Konformation zu ändern, wenn ein offenkettiger Elektronentransport möglich ist (Giaquinta et al. 1973, 1975; Reimer und Trebst 1975). Da die Methylviologen-Reduktion durch die Modifikation der Thylakoidmembran mit Diazoniumsalzen nur gehemmt wird, wenn während der Behandlung ein Elektronentransport stattfindet, kann man vermuten, daß die Komponenten, deren Modifikation die Hemmung verursacht, nur unter diesen Bedingungen den Modifiern zugänglich sind, d.h. eine Konformationsänderung der Thylakoidmembran im Bereich von Photosystem I angezeigt wird (Selman et al. 1974). Entgegen der ursprünglichen Erwartung wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß es mit dieser Methode nicht möglich ist, derartige Konformationsänderungen der Membran eindeutig nachzuweisen, da gleichzeitig die Diazoniumsalze zu einer reaktiven Verbindung reduziert werden. Ein Nachweis einer solchen Konformationsänderung in Photosystem I steht daher noch aus.

In Abb. 28 ist versucht, hypothetisch die Anordnung von Elektronencarriern auf der Akzeptorseite von Photosystem I dar-

zustellen, wie sie sich aufgrund der Studien mit Antiseren und chemischer Modifikation ergibt.

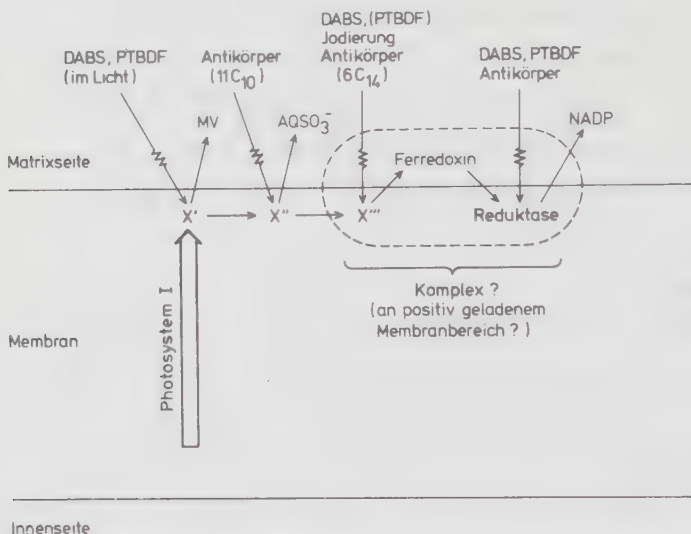


Abb. 28: Hypothetische Struktur der Akzeptorseite von Photosystem I (Erläuterungen im Text)

Dadurch, daß bei der Interpretation der Folgen von Modifikationen funktioneller Membranen deren Einfluß auf die räumliche Anordnung der Membrankomponenten neben dem direkten Einfluß auf katalytisch aktive Komponenten berücksichtigt werden muß, ist es möglich, daß X', X'' oder X''' keine bestimmte Komponente repräsentiert, sondern eine für die betreffende Reaktion notwendige strukturelle Integrität darstellt, die durch die Modifikation gestört wird.

Nach den Studien von Hiyama und Ke (Hiyama und Ke 1971a, b; Ke 1973) ist ein möglicher Kandidat für X' die kinetisch-spektroskopisch charakterisierte Komponente P_{430} . Diese Komponente,

die von P_{700} reduziert wird und deren Reoxidation unter anderem von Methylviologen stimuliert wird, ist wahrscheinlich ein gebundenes Eisen-Schwefel-Protein (Ke und Beinert 1973). Auch der am weitesten gereinigte P_{700} -Komplex, der noch in der Lage ist, Ferredoxin zu reduzieren (Bengis und Nelson 1975), enthält nach ESR-Untersuchungen Eisen-Schwefel-Protein (Nelson et al. 1975), jedoch kein Polypeptid, das aufgrund seines Molekulargewichtes als Eisen-Schwefel-Protein anzusehen wäre. Mit der Zerstörung des ESR-Signals des Eisen-Schwefel-Proteins des Komplexes durch SDS geht die Fähigkeit des Komplexes zur Ferredoxin-Reduktion verloren, während P_{700} photooxidierbar bleibt (Nelson et al. 1975). Antiseren gegen den Komplex hemmen, wie schon erwähnt, die Ferredoxin-Reduktion durch Photosystem I fast vollständig, die Methylviologen-Reduktion aber überhaupt nicht. Trotz der Befunde von Hiyama und Ke bleibt daher die Möglichkeit offen, daß Methylviologen nicht nur von P_{430} , sondern durch das Chlorophyll von Photosystem I direkt in einer Krasnovsky-Reaktion (Krasnovsky 1960) reduziert werden kann. In diesem Fall würde X' reduziertes Chlorophyll repräsentieren. Da die Antiseren gegen den P_{700} -Komplex Thylakoidvesikel direkt agglutinieren, muß das Reaktionszentrum von Photosystem I oder X' für sie zugänglich sein. Dies unterstützt die Interpretation der chemischen Modifikation der Membran mit Diazoniumsalzen im Licht (s. S. 73).

X' ist eine nicht identifizierte Komponente, die nach den Untersuchungen von Regitz (Regitz 1970, Regitz et al. 1970) an der Reduktion von Anthrachinonsulfonat, nicht aber von Methylviologen, beteiligt ist. Sie könnte der primäre Elektronenakzeptor von Photosystem I sein, falls der Reduktant von Me-

thylviologen, X', das reduzierte Chlorophyll von Photosystem I selber ist. X''' ist eventuell kein Elektronencarrier, sondern repräsentiert eine Struktur, deren Beeinträchtigung zu einer Hemmung der Reduktion von Ferredoxin durch Photosystem I führt. Die Mehrzahl der Antiseren, die Photoreduktionen durch Photosystem I hemmen, hemmen spezifisch X''', außerdem die Chemische Modifikation der Membranoberfläche (im Dunkeln) und die Lactoperoxidase-katalysierte Iodierung. Dies deutet an, daß X''' entweder der umgebenden wässrigen Phase besonders exponiert ist oder seine Hemmung nicht die Reaktion mit einer speziellen Komponente erfordert.

4. Zusammenfassung

Nach den heutigen Vorstellungen verläuft der photosynthetische Elektronentransport in der Thylakoidmembran der Chloroplasten vektoriell von der Innenseite der Membran zu ihrer Matrixseite, dem Ort der Reduktion von NADP. Der gerichtete Elektronentransport erfordert einen anisotropen Aufbau der Membran.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß der Veränderung der Oberfläche = Matrixseite der Thylakoidmembran von Spinat-Chloroplasten mit Antiseren und chemischen Sonden auf deren Funktion untersucht. Beide Methoden führen zur Modifikation der Membranoberfläche; als Folge davon sind Photoreduktionen durch Photosystem I gehemmt. Die Hemmstellen sind formal auf der Akzeptor-seite von Photosystem I lokalisiert. Ferredoxin-abhängige Reaktionen, wie die NADP-Reduktion, werden gegenüber Ferredoxin-unabhängigen Reaktionen, wie der Methylviologen-Reduktion, durch die Modifikationen bevorzugt gehemmt.

Die chemische Modifikation der Thylakoidmembran mit Diazoniumsalzen bei gleichzeitiger Belichtung verursacht eine im Gegensatz zur Modifikation im Dunkeln vollständige Hemmung der photosynthetischen Ferredoxin-Reduktion. Die Methylviologen-Reduktion wird teilweise gehemmt. Die Untersuchung der Bindung von ³⁵S-markiertem p-(Diazonium)-benzolsulfonat zeigt, daß die Bindung der Sonde bei Modifikation der Thylakoidmembran im Licht gegenüber der Modifikation im Dunkeln erhöht ist. Da dieser durch Licht verstärkte Einfluß der Modifikation durch den Elektronentransporthemmstoff DCMU verhindert wird, ist er als Folge des photosynthetischen Elektronentransportes in der Thylakoidmembran während der Modifikation im Licht anzusehen. Versuche mit Frag-

mentierung der Membran nach der Modifikation im Licht sprechen dafür, daß die durch die Modifikation hervorgerufene Hemmstelle nicht auf der Donorseite von Photosystem I lokalisiert ist, sondern die Funktion des Reaktionszentrums von Photosystem I oder von Komponenten auf der Akzeptorseite von Photosystem I beeinträchtigt wird.

Die erhöhte Hemmung der Chloroplastenfunktion bei Behandlung der Membran mit Diazoniumsalzen im Licht kann durch eine lichtabhängige Konformationsänderung der Membran im Bereich von Photosystem I erklärt werden. Eine andere Erklärung ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Diazoniumsalze durch die Chloroplasten in einer Hill-Reaktion reduziert werden können. Die Reduktion führt zu einem Produkt, das mit molekularem Sauerstoff reagiert. Dieses Produkt wird als ein Arylradikal angesprochen.

Wird die Modifikation der Membran im Licht unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, unter denen eine Reaktion des Reaktionsproduktes des Diazoniumsalzes mit Sauerstoff unmöglich ist, so wird die Bindung des Diazoniumsalzes gegenüber der Modifikation unter aeroben Bedingungen deutlich erhöht. Daraus kann geschlossen werden, daß die lichtabhängige Bindung, zumindest teilweise, auf der Bildung einer reaktiven Verbindung durch die Photoreduktion beruht und nicht auf der Azokupplung durch das Diazoniumsalz. Auch die durch die Modifikation im Licht verursachte verstärkte Hemmung des Elektronentransportes im Bereich von Photosystem I kann durch die Aktivierung der Sonde erklärt werden. Diese Ergebnisse schließen nicht aus, daß eine durch den Elektronentransport verursachte Konformationsänderung der Thylakoidmembran die lichtabhängigen Folgen der Modifikation hervorruft.

Die Charakterisierung des membrangebundenen Antigens, das die Hemmung der Ferredoxin-Photoreduktion durch ein Antiserum gegen

die Thylakoidmembran neutralisiert, führt zur Isolierung einer Proteinfraktion, die hauptsächlich ein Polypeptid mit dem Molekulargewicht von etwa 55 000 enthält. Die isolierte Fraktion hat keine fassbare katalytische Aktivität mehr, die dem neutralisierenden Antigen zuzuordnen wäre. Vermutlich handelt es sich bei dem neutralisierenden Antigen um ein Protein mit einer strukturellen Funktion auf der Akzeptorseite von Photosystem I. Das neutralisierende Antigen wird durch ein Diazoniumsalz *in situ* modifiziert. Dies bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß die Hemmung durch das Antiserum und die Diazoniumsalze auf der Reaktion mit derselben Membrankomponente beruht.

Die Hemmung der Ferredoxin-Photoreduktion durch das Antiserum und die chemische Modifikation der Membran (im Dunkeln) wird dahingehend interpretiert, daß sie durch einen Einfluß der Hemmstoffe auf die Struktur des Reduktionsortes von Ferredoxin an der Membran und nicht durch die spezifische Hemmung eines Elektronencarriers verursacht wird. Die Versuche zeigen, daß die Charakterisierung der Funktion einer Membran über die Identifizierung katalytisch aktiver Komponenten und Coenzyme hinausgeht. Strukturelle Komponenten der Membran beeinflussen die Reaktivität funktioneller Gruppierungen.

5. Material und Methoden

5.1. Präparation von Chloroplasten

Chloroplasten wurden aus entrippten Spinatblättern (*Spinacia oleracea* L.) ähnlich der Methode von Nelson et al. (1970) als "broken chloroplasts" isoliert. Dazu wurden ca. 50 g Blätter von Freiland- oder Gewächshaus-Spinat in 20 mM Tricin-NaOH-Puffer (pH 8,0), 0,4 M Saccharose, 10 mM NaCl, 40 mM Na-Ascorbat und 1 mg /ml RSA (insgesamt 140 ml) für 10 - 15 sec mit einem Sorvall Omni-Mixer bei voller Geschwindigkeit gemixt und durch 2 Lagen Nylongaze abgepresst. Das Filtrat wurde nach 3-minütiger Zentrifugation bei 3000 UpM im Sorvall SS 34 Rotor in 5 mM Tricin-NaOH-Puffer (pH 8,5) aufgenommen, abzentrifugiert und im Isolierungspuffer, jedoch ohne Na-Ascorbat, resuspendiert. Alle Schritte wurden bei 0-4°C durchgeführt.

5.2. Bestimmung der photosynthetischen Aktivitäten

5.2.1. NADP-Reduktion mit DAD/Ascorbat als Elektronendonator für Photosystem I

5.2.1.a. Küvettenversuche mit einem Reaktionsvolumen von 1 ml Testsystem in Anlehnung an Regitz und Oettmeier (1971).

In 1 ml waren enthalten:

Tris-HCl	20 mM	pH 8,0
NH ₄ Cl	5 mM	
DCMU	10 µM	
Na-Ascorbat	10 mM	
DAD·2HCl	0,1 mM	
NADP	1,5 mM	
Ferredoxin	5 µM	

Ferredoxin-NADP-Reduktase in sättigender Konzentration

Die Ansätze enthielten Chloroplasten-Fragmente entsprechend 10 - 20 µg Chl.

Die Küvetten mit einer optischen Weglänge von 1 cm wurden bei Raumtemperatur in Luft für 4 oder 5 min mit hitzegefiltertem Weißlicht einer Intensität von etwa 24 - 26 000 Lux belichtet. Aus der Extinktionsdifferenz vor und nach Belichtung, gemessen bei 365 nm mit einem Zeiss PL 4 Spektralphotometer, wurde mit einem Extinktionskoeffizienten von $3,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ die Geschwindigkeit der NADP-Reduktion berechnet.

5.2.1.b. Küvettenversuche mit einem Reaktionsvolumen von 3 ml
In 3 ml waren enthalten:

Tris-HCl	20 mM	pH 8,0
NH ₄ Cl	5 mM	
MgCl ₂	5 mM	
DCMU	6,6 μ M	
Na-Ascorbat	6,6 mM	
DAD $\cdot$ 2HCl	66 μ M	
NADP	1 mM	
Ferredoxin	3,3 μ M	

Ferredoxin-NADP-Reduktase in sättigender Konzentration

Die Ansätze enthielten Chloroplasten-Fragmente mit 30 μ g Chl.
Die Küvetten mit einer optischen Weglänge von 1 cm wurden bei Raumtemperatur in Luft von der Seite mit Rotlicht (Schott RG 645), Intensität ca. $1,5 \times 10^5$ erg/cm²/sec belichtet. Die Absorptionszunahme bei 340 nm wurde kontinuierlich mit einem umgebauten Zeiss PMQ 2 Spektralphotometer während der Belichtung mit einem Schreiber (Perkin Elmer Recorder 56) mitgeschrieben. Der Empfänger des Spektralphotometers war durch einen zusätzlichen Monochromator (Zeiss M 20) vor Streulicht geschützt. Mit einem Extinktionskoeffizienten von $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ wurde die Anfangsgeschwindigkeit der NADP-Reduktion berechnet.

5.2.1.c. Messung im Warburg-Apparat

In konischen Warburg-Gefäßen von etwa 14 ml Gesamtvolumen befand sich ein Reaktionsgemisch von 3 ml.

Es enthielt:

Tris-HCl	20 mM	pH 8,0
NH ₄ Cl	5 mM	
DCMU	20 μ M	
Na-Ascorbat	6,6 mM	
DAD $\cdot$ 2 HCl	66 μ M	
NADP	2 mM	
Ferredoxin	3,3 μ M	

Ferredoxin-NADP-Reduktase in sättigender Konzentration

Die Ansätze enthielten Chloroplasten-Fragmente mit 100 μ g Chl.
Sie wurden 3 min mit N₂ begast und anschließend für 12 oder 15 min bei 15°C mit Weißlicht (Lichtintensität 20 000 Lux) belicht-

et. Zur Bestimmung des gebildeten NADPH wurden die Proben abzentrifugiert (Piccolo, Heraeus Christ, 5 min bei maximaler Geschwindigkeit), 0,5 ml des Ueberstandes mit H_2O 1:6 verdünnt und aus der Extinktionsdifferenz bei 340 nm (Zeiss PM 4 Spektralphotometer) vor und nach der Zugabe von 0,03 ml einer Lösung von Phenazoniummethosulfat (9 mg/10 ml H_2O) mit einem Extinktionskoeffizienten von $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ die Geschwindigkeit der NADPH-Bildung berechnet.

5.2.2. Methylviologen- und Anthrachinonsulfonat-Reduktion mit DAD/Ascorbat als Elektronendonator für Photosystem I

Gemessen wurde die durch reduziertes MV ($AQSO_3^-$) katalysierte O_2 -Aufnahme mit einer Teflon-Membran-bedeckten (Konzentrations-) Elektrode, (Eigenbau von Dr. J.-D. Schwenn nach Delieu und Walker 1972).

In 2 ml Reaktionsgemisch waren enthalten:

Tris-HCl	30 mM	pH 8,0
NH_4Cl	5 mM	
DCMU	10 μM	
DAD $\cdot$ 2 HCl	0,1 mM	
MV	0,2 mM	
oder: $AQSO_3H$	0,2 mM	
NaN_3	0,5 mM	

Die Ansätze enthielten Chloroplasten-Fragmente mit 10 - 20 μg Chl. Sie wurden mit hitzegefiltertem Weißlicht von etwa 25 000 Lux belichtet. Die Sauerstoffkonzentration der Reaktionsmischung wurde mit einem Schreiber (Perkin Elmer Recorder 56) kontinuierlich mitgeschrieben und aus der Steigung die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet. Das Reaktionsgefäß war auf 20°C thermostatisiert, als Sauerstoff-Konzentration bei dieser Temperatur wurde (Luftsättigung) 0,28 $\mu Mol O_2/1 \text{ ml}$ angenommen.

5.3. Bestimmung der Polyphenoloxidase-Aktivität

In 3 ml Reaktionslösung waren enthalten:

K-Na- PO_4	10 mM	pH 7,0
Dopamin $\cdot HCl$	1,7 mM	

und eine geeignete Menge Protein.

Die Tests wurden in Küvetten mit einer optischen Weglänge von

1 cm durchgeführt, die Temperatur war Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dopamin gestartet, das Entstehen des rotbraunen Oxidationsproduktes bei 480 nm mit einem Zeiss PM 4 Spektralphotometer verfolgt. Als Nullwert diente Reaktionslösung ohne Enzym. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde der Teil einer Konzentrationskurve verwendet, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Proteinkonzentration war.

5.4. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung diente die Methode von Lowry (Lowry et al. 1951). Standard war Rinderserumalbumin.

5.5. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach der Methode von Arnon (1949).

5.6. Quantitative Bestimmung des an die Thylakoidmembran gebundenen DABS

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe von ^{35}S -markiertem DABS. Die Methode entspricht im wesentlichen der von Giaquinta et al. (1974 b).

Aliquots der nach der Reaktion mit DABS gewaschenen Thylakoidsysteme mit etwa 25 μg Chl wurden in Scintillationsfläschchen mit 0,1 - 0,2 ml 30% H_2O_2 für 2-3 h auf 70°C erhitzt. Nachdem die Lösung farblos geworden war, wurden 5 ml Aquasol Universal L.S.C. Cocktail (New England Nuclear) zugegeben und die Radioaktivität in einem Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer Model 3385 bestimmt.

5.7. Quantitative Bestimmung von DABS in Lösung

Die Methode ist ein Teilschritt der Nitrit-Bestimmung nach Gries-Ilosvay (vergl. Kolditz 1974).

Ein Aliquot der DABS-enthaltenden Lösung wurde mit einer 0,1 M Lösung von α -Naphthylamin in 6 M Essigsäure gemischt. Nach 30 min Stehen bei Raumtemperatur wurde die Extinktion des gebildeten roten Azofarbstoffes bei 530 nm mit einem Zeiss PM 4 Spektralphotometer gemessen. Die α -Naphthylamin-Lösung diente als Referenz. Wenn DABS in einer Chloroplastensuspension bestimmt wurde, diente

ein entsprechendes Aliquot der Chloroplastensuspension, das vor der Zugabe von DABS mit der Naphthylamin-Lösung gemischt wurde, als Referenz. Die Konzentration von DABS wurde an einer Eichkurve abgelesen.

5.8. SDS-Gelelektrophorese und Bestimmung des Molekulargewichtes

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Weber und Osborn (1969) durchgeführt. Die Gele wurden, wie bei Nelson et al. (1973) beschrieben, mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt und entfärbt. Als Referenzproteine für die Molekulargewichtsbestimmung dienten (Molekulargewichte in Klammern): Phosphorylase a (94 000), Rinderserumalbumin (68 000), Pyruvat-Kinase (57 000), Ovalbumin (43 000), Pepsin (35 000), und die Untereinheiten von -Chymotrypsin (25 000, 13 000, 11 000).

Ich bin Herrn Dr. N. Nelson, Haifa, für die Durchführung der Molekulargewichtsbestimmung zu Dank verpflichtet.

5.9. Immundiffusion

Die Immundiffusion nach Ouchterlony wurde in Agarose-Platten (2,5 x 7,5 cm, 0,8% Agarose in 0,15 M NaCl) durchgeführt. Die Diffusionszeit betrug 24 h bei Raumtemperatur in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Platten wurden dann 24 h mit 0,15 M NaCl inkubiert, wobei die NaCl-Lösung dreimal gewechselt wurde. Nach 12 h Inkubation in dest H₂O wurde das Gel an der Luft getrocknet. Fixiert und gefärbt wurden die Präzipitationslinien mit einer Lösung von 40% CH₂OH, 10% CH₃COOH und 0,1% Amidoschwarz für 30 min, entfärbt mit 45% CH₃OH und 10% CH₃COOH.

5.10. Chemische Modifikation mit Diazoniumsalzen

5.10.1. Modifikation von "broken chloroplasts"

Für die Modifikation wurden die als "broken chloroplasts" isolierten Chloroplasten (vergl. 5.1.) zweimal mit etwa 40 ml 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl pro 10 mg Chl gewaschen und in demselben Puffer mit einer Konzentration von 1 mg Chl/ml resuspendiert. Abweichungen von dieser Konzentration sind in den Legenden zu den Abbildungen und Tabellen angegeben.

Zu den magnetisch gerührten Chloroplastensuspensionen wurden entsprechende Aliquots von 20 mM Stammlösungen der Diazoniumsalze in

demselben Puffer mit einer Spritze zugegeben. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Suspensionen 15-20-fach mit 0,02 M Tris-HCl (pH 8,0), der 5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0,4 M Saccharose und 2 mg/ml Rinderserumalbumin enthielt, verdünnt und möglichst rasch für 5 min bei 10 000 UpM im Sorvall SS 34 Rotor zentrifugiert. Bei Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität wurden die Chloroplasten dann dreimal, sonst zweimal, mit demselben Volumen dieses Tris-Puffers gewaschen und schließlich in diesem Puffer mit einer Konzentration von etwa 0,5 mg Chl/ml resuspendiert. Im Falle der Modifikation mit PTBDF wurden die Kontrollchloroplasten statt mit dem entsprechenden Volumen K-Phosphat-Puffer mit einer der BF_4^- -Konzentration der PTBDF-Lösung entsprechenden Lösung von NaBF_4 in K-Phosphat-Puffer inkubiert. Die Kontroll-Chloroplasten wurden im übrigen wie die modifizierten Chloroplasten behandelt.

5.10.2. Modifikation von Digitoninpartikeln, Digitonin-Fragmentierung

(Photosystem I-) Digitoninpartikel wurden nach der Methode von Elstner et al. (1968) durch Inkubation von "broken chloroplasts" in 1% Digitonin (1 mg Chl/ml) für 1 h bei 4°C und anschließende differentielle Zentrifugation (20 min 40 000 x g, Ueberstand 1 h 200 000 x g) isoliert.

Für die DABS-Behandlung wurden die Digitonin-Partikel in 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl aufgenommen (1 mg Chl/ml). Die Inkubation wurde wie für die Thylakoidsysteme beschrieben durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 40-faches Verdünnen mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) beendet, der 0,1 M NaCl und 2 mg/ml Rinderserumalbumin enthielt, die Partikel 1 h bei 200 000 x g abzentrifugiert und in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

5.11. Isolierung von HM 275

Die Methode entspricht im wesentlichen der von Regitz (Regitz 1970, Regitz und Oettmeier 1971).

Gewaschene Spinatblätter wurden unter Zusatz von 0,02 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) in einer Dreiwalzenmühle zerkleinert, durch Nylongaze abgepresst und das Filtrat 15 min bei 40 000 x g zentrifugiert. Die abzentrifugierten Chloroplastenfragmente wurden in 0,02

M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und nach dem Bestimmen des Chlorophyllgehaltes lyophilisiert.

In typischen Aufarbeitungen wurde von lyophilisierten Chloroplastenfragmenten mit 500-800 mg Chl ausgegangen. Sie wurden auf einer Glasfritte mit - 40°C kaltem Diäthyläther (ca. 5 ml/mg Chl) extrahiert. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und in etwa 40 ml eiskaltem H_2O /500 mg Chl resuspendiert, die Suspension 2 h unter langsamem Rühren bei 4°C extrahiert und dann 30 min bei 40 000 x g zentrifugiert. Der Ueberstand wurde in zwei Hälften an einer Sephadex G-75-Säule (4 x 40 cm, äquilibriert mit 0,02 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0)) chromatographiert. Der erste (grüne) und der zweite (Protein-) Elutionspeak wurden vereinigt, gegen 0,02 M K-Na-Phosphat-Puffer (pH 8,0) dialysiert und an einer mit diesem Puffer äquilibrierten CM-Sephadex-Säule (4 x 15 cm) chromatographiert, ohne daß HM 275 adsorbiert wird. Die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen wurden an einer DE-52-Säule (Whatman, 2 x 5 cm, äquilibriert mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,3)) chromatographiert, wobei HM 275 adsorbiert wird. Die Säule wurde nacheinander mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,3), 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,3) + 0,05 M NaCl, dann + 0,1 M NaCl solange eluiert, bis die Extinktion des Eluates bei 275 nm $\leq 0,05$ war. HM 275 wurde mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,3) + 0,3 M NaCl von der Säule eluiert. Die vereinigten HM 275 enthaltenden Fraktionen wurden mit festem $(NH_4)_2SO_4$ unter Kontrolle des pH fraktioniert (30-50% Sättigung) präzipitiert, das Protein durch 5 min Zentrifugation bei 12 000 x g gesammelt und in 0,02 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) gelöst. Nach wiederholter Dialyse gegen diesen Puffer wurde das Protein bei -20°C aufbewahrt.

5.12. Synthese der Diazoniumsalze

5.12.1. Synthese von ^{32}S -DABS und ^{35}S -DABS

^{32}S -DABS wurde nach einer Vorschrift der Firma Merck (Chromatographie, E. Merck AG, ohne Jahr) durch Diazotierung von ^{32}S -Sulfanilsäure als inneres Salz kristallisiert, gereinigt und bei -20°C trocken aufbewahrt. Die Säure wurde unmittelbar vor Gebrauch in eiskaltem 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,2) + 0,1 M NaCl gelöst und in Eis für nicht länger als 1 h vor Gebrauch aufbewahrt.

^{35}S -DABS wurde durch Diazotierung von ^{35}S -Sulfanilsäure nach der Methode von Hoyer und Trebold (1970) synthetisiert und als Lösung (20 mM) bei -70°C aufbewahrt. Diese Lösung wurde vor den Versuchen mit einer Lösung von inaktivem DABS verdünnt. Die spezifische Aktivität der eingesetzten Lösung war in der Größenordnung von $5 \times 10^5 \text{ cpm}/\mu\text{Mol DABS}$.

Die ^{35}S -Sulfanilsäure stammte von Amersham Buchler.

5. 12.2. Synthese von PTBDF

PTBDF wurde nach der von Traylor und Singer (1967) beschriebenen Methode synthetisiert. Da die von diesen Autoren verwendete Ausgangssubstanz p-(Dimethylammonium-)acetanilid nicht zugänglich war, wurde sie nach der Methode von Hogdson und Crook (1932) aus N,N-Dimethyl-p-phenylendiammonium-dichlorid synthetisiert. Die Synthese wurde durch Bestimmung der Schmelzpunkte der Zwischenprodukte verfolgt. Das als $\text{PTBDF}^{2+} \cdot 2 \text{BF}_4^-$ kristallisierte Produkt wurde durch das Mikroanalytische Laboratorium Pascher, Bonn, analysiert. Ergebnis (in Klammern die berechneten Werte): C 32,20% (32,09%); H 3,84% (3,90%); N 12,32% (12,47%)

5.13. Immunisierungsschema

2 ml HM 275 mit 1,5 mg Protein wurde mit Freund's Adjuvans (Difco, complete) auf 4,5 ml aufgefüllt und durch Ultraschall emulgiert. Die Paste wurde, auf zwei Kaninchen verteilt, in die Lendenballen der rechten Hinterpfote (je $2 \times 0,5 \text{ ml}$) subcutan und in den Rücken (je 6-8 Portionen) intradermal gespritzt. Nach 4 Wochen wurden beide Tiere am Abend und am darauffolgenden Morgen mit jeweils 0,4 ml HM 275 (1,5 mg Protein/ml) geboostert. Eine Woche danach wurde in zweitägigem Abstand Blut aus der Ohrvene entnommen (Serum /2 bis /4). Etwa 4 Wochen später wurde erneut Blut entnommen (Serum /5) und mit je 0,5 ml HM 275 (1,5 mg Protein/ml) erneut geboostert. Nach einer Woche wurde erneut Blut aus der Ohrvene entnommen und 3 Tage darauf die Tiere ausbluten lassen (Serum /7 und /8).

Ich bin Herrn Dr. R. J. Berzborn für die Hilfe bei der Gewinnung der Seren und für ihre Charakterisierung sehr dankbar.

5.14. Kofaktoren

Ferredoxin wurde aus Spinat nach der Vorschrift von Shin et al.

(1963) isoliert, Ferredoxin-NADP-Reduktase nach der Vorschrift von Wessels (1965).

Cytochrom 552 aus Euglena wurde freundlicherweise von Herrn Dr. E. F. Elstner zur Verfügung gestellt.

6. Literaturverzeichnis

- Anderson, J. M.
Biochim. Biophys. Acta 416, 191-235 (1975)
- Arnon, D. I.
Plant Physiol. 24, 1-15 (1949)
- Arnon, R.
Current Topics in Microbiology and Immunology 54,
47-93 (1971)
- Arntzen, C. J., Armond, P. A., Zettinger, C. S., Vernotte, C.,
Briantais, J. M.
Biochim. Biophys. Acta 347, 329-339 (1974)
- Ash, O. K., Zaugg, W. S., Vernon, L. P.
Acta Chem. Scand. 15, 1629-1638 (1961)
- Bengis, C., Nelson, N.
J. Biol. Chem. 250, 2783-2788 (1975)
- Berg, H. C.
Biochim. Biophys. Acta 183, 65-78 (1969)
- Berzborn, R. J.
Z. Naturforsch. 23b, 1096-1104 (1968)
- Berzborn, R. J.
Z. Naturforsch. 24b, 436-446 (1969)
- Berzborn, R. J., Menke, W., Trebst, A., Pistorius, E.
Z. Naturforsch. 21b, 1057-1059 (1966)
- Berzborn, R. J., Lockau, W.
In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series -
Photosynthesis, Vol. 1, Photosynthetic Electron Trans-
port, (ed. A. Trebst, M. Avron), Chapter 2.17 (im Druck)
- Brand, J., Baszynski, T., Crane, F. L., Krogmann, D. W.
Biochem. Biophys. Res. Com. 45, 538-543 (1971)
- Brand, J., San Pietro, A. Mayne, B. C.
Arch. Biochem. Biophys. 152, 426-428 (1972a)
- Brand, J., Baszynski, T., Crane, F. L., Krogmann, D. W.
J. Biol. Chem. 247, 2814-2819 (1972b)
- Cadogan, J. I. G.
In: Free Radicals in Solution, London: Butterworths
(1966)

Chromatographie

E. Merck AG, Darmstadt (ohne Jahr)

Cinader, B.

Ann. NY Acad. Sci. 103, 495-548 (1963)

Deamer, D. W., Crofts, A. R., Packer, L.

Biochim. Biophys. Acta 131, 81-96 (1967)

Delieu, T., Walker, D. A.

New Phytol. 71, 201-225 (1972)

De Tar, D. F., Turetzky, M. N.

J. Am. Chem. Soc. 77, 1745-1750 (1955)

Dilley, R. A., Peters, G. A., Shaw, E. R.

J. Membrane Biol. 8, 163-180 (1972)

Elstner, E. F., Pistorius, E., Böger, P., Trebst, A.

Planta (Berl.) 79, 146-161 (1968)

Elstner, E. F., Selman, B. R., Stoffer, C.

in Vorbereitung

Evans, M. C. W., Reeves, S. G., Cammack, R.

FEBS Letters 49, 111-114 (1974)

Fowler, C. F., Kok, B.

Biochim. Biophys. Acta 357, 308-318 (1974)

Giaquinta, R. T., Dilley, R. A., Anderson, B. J.

Biochem. Biophys. Res. Com. 52, 1410-1417 (1973)

Giaquinta, R. T., Dilley, R. A., Selman, B. R., Anderson, B. J.

Arch. Biochem. Biophys. 162, 200-209 (1974a)

Giaquinta, R. T., Dilley, R. A., Anderson, B. J., Horton, P.

Bioenergetics 6, 167-177 (1974b)

Giaquinta, R. T., Dilley, R. A.

In: Proc. 3rd Int. Congr. Photosyn. Res., (ed. M. Avron), Rehovot, pp. 883-895, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam (1974 c)

Giaquinta, R. T., Ort, D. R., Dilley, R. A.

Biochemistry 14, 4392-4396 (1975)

Hauska, G. A.

FEBS Letters 28, 217-220 (1972)

Hauska, G. A., Mc Carty, R. E., Berzborn, R. J., Racker, E.

J. Biol. Chem. 246, 3524-3531 (1971)

Hauska, G. A., Trebst, A., Draber, W.

Biochim. Biophys. Acta 305, 632-641 (1973)

Hay, J. M.

In: Reactive Free Radicals, Academic Press, London

- und New York (1974)
- Hiedemann-Van Wyk, D., Kannangara, G. G.
Z. Naturforsch. 26b, 46-50 (1971)
- Hind, G., Jagendorf, A. T.
J. Biol. Chem. 240, 3195-3201 (1965)
- Hiyama, T., Ke, B.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1010-1013 (1971a)
- Hiyama, T., Ke, B.
Arch. Biochem. Biophys. 147, 99-108 (1971b)
- Hogdson, H. H., Crook, T. H.
J. Chem. Soc. London, 2976-2977 (1932)
- Holton, R. W., Myers, J.
Science 142, 234-235 (1963)
- Hoyer, L. W., Trebold, N. C.
J. Clin. Invest. 49, 87 (1970)
- Hückel, W.
In: Theoretische Grundlagen der Organischen Chemie
Band 1, 9. Aufl., Akad. Verlagsgesellschaft Geest
und Portig KG, Leipzig (1961)
- Junge, W., Witt, H. T.
Z. Naturforsch. 23b, 244-254 (1968)
- Ke, B.
Biochim. Biophys. Acta 301, 1-33 (1973)
- Ke, B., Beinert, H.
Biochim. Biophys. Acta 305, 689-693 (1973)
- Klein, S. M., Vernon, L. P.
Photochem. Photobiol. 19, 43-49 (1974)
- Koenig, F., Menke, W., Craubner, H., Schmid, G., Radunz, A.
Z. Naturforsch. 27b, 1225-1238 (1972)
- Kok, B., Hoch, G.
In: Light and Life, (ed. W. D. Mc Elroy, B. Glass),
Johns Hopkins Press, Baltimore, Md. (1961)
- Kolditz, L.
Anorganikum, 6. Auflage, VEB Deutscher Verlag der
Wissenschaften, Berlin (1974)
- Krasnovsky, A. A.
Ann. Rev. Plant Physiol. 11, 363-410 (1960)
- Levine, R. P., Burton, W. G., Duram, H. A.
Nature New Biology 237, 176-177 (1972)

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
- Matson, R. S., Kimura, T.
Biochim. Biophys. Acta 396, 293-300 (1975)
- Mc Carty, R. E., Pittman, P. R., Tsuchiya, Y.
J. Biol. Chem. 247, 3048-3051 (1972)
- Mc Carty, R. E., Fagan, J.
Biochemistry 12, 1503-1507 (1973)
- Melchers, F., Messer, W.
Eur. J. Biochem. 35, 380-385 (1973)
- Menke, W., Koenig, F., Radunz, A., Schmid, G. H.
FEBS Letters 40, 372-375 (1975)
- Morrison, R. T., Boyd, R. N.
In: Organic Chemistry, 2nd Edition, Allyn and Bacon, Inc., Boston (1971)
- Nakaya, K., Ariga, K., Haraguchi, T., Nakamura, Y.
Biochim. Biophys. Acta 216, 364-372 (1970)
- Nelson, N., Drechsler, Z., Neumann, J.
J. Biol. Chem. 245, 143-151 (1970)
- Nelson, N., Deters, D. W., Nelson, H., Racker, E.
J. Biol. Chem. 248, 2049-2055 (1973)
- Nelson, N., Bengis, C., Silver, B. L., Getz, D., Evans, M. C. W.
FEBS Letters 58, 363-365 (1975)
- Oettmeier, W., Lockau, W.
Z. Naturforsch. 28c, 717-721 (1973)
- Ouchterlony, O.
In: Handbook of Immunodiffusion and Immunelektrophoresis, Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Mich. (1968)
- Parish, R. W.
Eur. J. Biochem. 31, 446-455 (1972)
- Follack, M. R.
Immunology 7, 707-723 (1964)
- Racker, E., Hauska, G. A., Lien, S., Berzborn, R. J., Nelson, N.
In: Proc. 2nd Int. Congr. Photosyn. Res., (ed. G. Forti, M. Avron, A. Melandri), Stresa, pp. 1097-1113, The Hague: Dr. W. Junk, N. V., (1971)
- Regitz, G.
Dissertation, Göttingen (1970)

- Regitz, G., Berzborn, A., Trebst, A.
Planta (Berl.) 91, 8-17 (1970)
- Regitz, G., Oettmeier, W.
In: Proc. 2nd Int. Congr. Photosyn. Res., (ed. G. Forti,
M. Avron, A. Melandri), Stresa, pp. 499-506, The Hague:
Dr. W. Junk, N. V., (1971)
- Reimer, S., Trebst, A.
Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 225-232 (1975)
- Rumberg, B.
Nature (Lond.) 204, 860-862 (1964)
- Ryrie, I. J., Jagendorf, A. T.
J. Biol. Chem. 246, 3771-3774 (1971)
- Ryrie, I. J., Jagendorf, A. T.
J. Biol. Chem. 247, 4453-4459 (1972)
- Schliephake, W., Junge, W., Witt, H. T.
Z. Naturforsch. 23b, 1571-1578 (1968)
- Schneeman, R., Krogmann, D. W.
J. Biol. Chem. 250, 4965-4971 (1975)
- ^hSchneider, D. L., Kagawa, Y., Racker, E.
J. Biol. Chem. 247, 4074-4079 (1972)
- Selman, B. R., Bannister, T. T.
Biochim. Biophys. Acta 347, 329-339 (1974)
- Selman, B. R., Giaquinta, R. T., Dilley, R. A.
Arch. Biochem. Biophys. 162, 210-214 (1974a)
- Selman, B. R., Johnson, G. L., Dilley, R. A., Voegeli, K. K.
In: Proc. 3rd Int. Congr. Photosyn. Res., (ed. M.
Avron), Rehovot, pp. 897-909, Elsevier Scientific
Publishing Company, Amsterdam (1974b)
- Shin, M. K., Tagawa, K., Arnon, D. I.
Biochem. Z. 338, 84-96 (1963)
- Singer, S. J., Nicolson, G. L.
Science 175, 720-731 (1972)
- Traylor, P. S., Singer, S. J.
Biochemistry 6, 881-887 (1967)
- Trebst, A.
In: Methods in Enzymology, (ed. S. P. Colowick, N. O.
Kaplan), Vol. XXIV, pp. 146-165, Academic Press, Lon-
don and New York, (1972)

- Trebst, A.
Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 423-458 (1974)
- Trebst, A., Wagner, S.
Z. Naturforsch. 17b, 396-400 (1962)
- Weber, K., Osborn, M.
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)
- Wessels, J. S. C.
Biochim. Biophys. Acta 109, 357-371 (1965)
- Wildner, G. F., Hauska, G.
Arch. Biochem. Biophys. 164, 136-144 (1974)
- Witt, H. T., Rumberg, B., Schmidt-Mende, P., Siggel, U., Skerra, B., Vater, J., Weikard, J.
Angew. Chem. (Int. Ed.) 4, 799 (1965)
- Yocum, C. F., San Pietro, A.
Biochem. Biophys. Res. Com. 36, 614-620 (1969)
- Yocum, C. F., San Pietro, A.
Arch. Biochem. Biophys. 140, 152-157 (1970)

Lebenslauf

Am 8. Nov. 1948 wurde ich als zweites Kind des Revierförsters Fritz Lockau und seiner Frau Ilse geb. Vallay in Seeheim, Kreis Darmstadt, geboren. Im Jahre 1955 wurde ich in die dortige Volksschule eingeschult. Im Jahre 1959 wechselte ich auf den altsprachlichen Zweig des Alten Kurfürstlichen Gymnasiums in Bensheim a.d.B. über, wo ich 1967 die Abiturprüfung ablegte. Vom Wintersemester 1967/1968 an studierte ich an der TH Darmstadt Biologie und Chemie und legte nach dem 4. Semester die Vordiplomsprüfung in Biologie ab. Zum Wintersemester 1971/1972 wechselte ich zur Ruhr-Universität Bochum über, wo ich nach der mündlichen Diplomprüfung im Wintersemester 1972/1973 eine Diplomarbeit mit dem Titel "Eigenschaften und chemische Charakterisierung der Cytochrom-c-reduzierenden Substanz aus *Anabaena cylindrica*" anfertigte. Der Diplomgrad wurde mir am 21.5.1973 verliehen.

Seit dem Sommer 1973 arbeitete ich am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Trebst an der vorliegenden Dissertation.

